

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 144**

51 Int. Cl.:

C07K 14/765 (2006.01)

A61K 38/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.02.2011 PCT/US2011/024855**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011 WO11103076**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2011 E 11745103 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2536756**

54 Título: **Composiciones relacionadas con SAH y métodos de uso**

30 Prioridad:

15.07.2010 US 364503 P
16.02.2010 US 304954 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.08.2018

73 Titular/es:

MEDIMMUNE, LLC (100.0%)
One Medimmune Way
Gaithersburg, MD 20878, US

72 Inventor/es:

GAO, CHANGSHOU;
CHAUDHURY, CHAITY y
YAO, XIAOTAO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 678 144 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

Composiciones relacionadas con SAH y métodos de uso

5 1 Antecedentes de la invención

El receptor Fc neonatal (FcRn) prolonga la vida tanto de IgG como de seroalbúmina humana (SAH), por un mecanismo dependiente del pH, uniéndose específicamente a ambas moléculas al pH ácido del endosoma y reciclándolas de nuevo a la superficie celular, desviando de este modo ambas moléculas de la ruta de degradación lisosómica por defecto. Se ha demostrado que la capacidad de unión a FcRn es intrínseca al dominio III de albúmina.

2 Sumario de la invención

15 En este documento se divulgan composiciones relacionadas con SAH y métodos de uso. La presente invención proporciona polipéptidos quiméricos que comprenden una parte de seroalbúmina bovina (SAH) que comprende un fragmento de unión de FcRn neonatal y un polipéptido heterólogo o un fragmento bioactivo del mismo como se define en las reivindicaciones, así como composiciones que comprenden los polipéptidos quiméricos en combinación con un vehículo farmacéutico como se define en las reivindicaciones. También se proporcionan en este documento construcciones para producir dichos polipéptidos quiméricos como se define en las reivindicaciones. La invención proporciona además polipéptidos que comprenden una parte de seroalbúmina humana (SAH), que es una parte de SAH que comprende el dominio III de SAH, o un fragmento de unión al receptor Fc neonatal (FcRn) del mismo, en el que el dominio III de SAH es como se define en las reivindicaciones. La invención también proporciona polipéptidos quiméricos que comprenden una parte de seroalbúmina humana (SAH), que es una parte de SAH que comprende el dominio III de SAH, o un fragmento de unión al receptor Fc neonatal (FcRn) del mismo, y una proteína heteróloga, en la que el polipéptido quimérico retiene una actividad funcional de la proteína heteróloga y puede unirse a un FcRn, y el dominio III de SAH comprende al menos una sustitución de aminoácido para aumentar una o ambas de la afinidad por FcRn y semivida en suero del polipéptido quimérico respecto a un polipéptido quimérico de control en que la parte de SAH no incluye dichas sustituciones de aminoácido como se define en las reivindicaciones. Adicionalmente, en este documento se proporcionan métodos de aumento de la semivida en suero de una proteína como se define en las reivindicaciones.

El polipéptido quimérico de la presente invención tiene una o ambas de afinidad aumentada por FcRn y semivida en suero aumentada respecto a un polipéptido de control como se define en las reivindicaciones. En determinadas realizaciones, el polipéptido quimérico tiene una semivida en suero aumentada. En determinadas realizaciones, el polipéptido quimérico tiene tanto afinidad aumentada por FcRn como semivida en suero aumentada. En determinadas realizaciones, el polipéptido quimérico tiene afinidad aumentada por FcRn a pH ácido (por ejemplo, pH de aprox. 5,5). En otras realizaciones, el polipéptido quimérico tiene afinidad aumentada por FcRn a pH ácido (por ejemplo, pH de aprox. 5,5), la afinidad del polipéptido quimérico por FcRn a pH neutro (por ejemplo, pH de aprox. 7,4) no se altera sustancialmente.

La divulgación contempla todas las combinaciones de cualquiera de los aspectos y realizaciones anteriores, así como combinaciones con cualquiera de las realizaciones expuestas en la descripción detallada y los ejemplos.

45 La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

3 Breve descripción de los dibujos

Con el fin de ilustrar la invención, se representan en los dibujos determinadas realizaciones de la invención. Sin embargo, la invención no está limitada a las disposiciones precisas e instrumentos de las realizaciones representadas en los dibujos.

La figura 1 proporciona el análisis cinético y de equilibrio de la unión de FcRn humano al dominio III de seroalbúmina humana (SAH). En esta ocasión se presentan la cinética de asociación, disociación derivada de SPR y la constante de unión en equilibrio para la unión de FcRn humano al dominio III inmovilizado a pH 5,5. La figura 1A representa un gel de PAGE teñido con Coomassie que documenta la expresión satisfactoria y purificación del dominio III de SAH a partir de *Pichia Pastoris* (indicada por flecha). La figura 1B representa un sensograma de unión generado por la inyección de una gama de concentraciones de FcRn sobre el dominio III inmovilizado en un chip CM5. La figura 1C representa un diagrama de la respuesta de unión en equilibrio frente a la concentración de FcRn ajustado al modelo de afinidad en equilibrio.

La figura 2 proporciona una representación esquemática de diversos diseños de construcción, así como información respecto a la purificación y caracterización de IgG fusionada a SAH e IgG fusionada el dominio III. La figura 2A representa la construcción de ADN de la cadena pesada de la proteína de fusión recombinante de IgG-SAH o IgG-dominio III, así como la variante YTE. La figura 2B representa el análisis de SDS PAGE de proteínas de fusión

purificadas (5 µg/carril) en condiciones reductoras y no reductoras. La figura 2C representa la cromatografía por exclusión de tamaño analítica de proteínas de fusión de IgG purificadas.

La figura 3 proporciona las constantes en equilibrio derivadas de SPR para la unión de FcRn humano a IgG fusionada con SAH e IgG fusionada con el dominio III. Se representaron las UR en equilibrio (R_{eq}) para cada inyección de FcRn frente a la concentración de FcRn humano, y los datos se ajustaron a un modelo de afinidad en equilibrio para calcular la K_D para IgG inmovilizada (panel A), IgG fusionada a SAH (panel B) e IgG fusionada al dominio III (panel C). Los sensogramas en los recuadros muestran la masa (unidades de resonancia) de FcRn unido a ligando inmovilizado en el eje de ordenadas después de la sustracción del blanco frente al tiempo en el eje de abscisas.

La figura 4 proporciona evidencias que indican que el epítipo en SAH para FcRn es un epítipo conformacional. Se incubó Sepharose (S)-SAH, S-IgG o S-Tris tratados de tres maneras diferentes con FcRn a pH 5,5. Se eluyó el FcRn unido y se cuantificó por inmunotransferencia con anticuerpo anti-β2 microglobulina. Se muestran las posiciones de los marcadores de peso molecular (M, in kD). El carril 1 contiene 20 µg de FcRn humano, la cantidad añadida a cada muestra adsorbente.

La figura 5 muestra que SAH y el dominio III presentados en la superficie de células de levadura (*S. cerevisiae*) retienen la capacidad de unión a FcRn. La figura 5A representa la detección por citometría de flujo de SAH o el dominio III en células de *S. cerevisiae* transformadas con un plásmido de presentación en superficie celular pYD1 inducible por galactosa usando anticuerpo anti-SAH conjugado con FITC. Las células se indujeron con galactosa durante los tiempos indicados. El panel B representa la unión de FcRn humano biotinilado a SAH o el dominio III presentado en células de *S. cerevisiae* inducidas durante 48 h y visualizadas por ficoeritrina antiestreptavidina usando citometría de flujo. Se usaron células de levadura transformadas con un scfv como control para la fluorescencia de fondo para FITC, así como ficoeritrina. Los experimentos se expresan como histogramas de intensidad de fluorescencia (escala logarítmica) frente a la cantidad de células.

La figura 6 proporciona una alineación de secuencias de aminoácidos del dominio III de diferentes especies (ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jervo de Mongolia, oveja, gato y caballo). La alineación en los paneles A-D incluye pollo mientras que los paneles EH- excluyen pollo. Los restos de aminoácido conservados entre la diferentes especies están marcados con una línea continua y los restos de cisteína conservados están marcados con una línea discontinua. Los restos de aminoácido sombreados no están conservados entre las especies. Obsérvese que la numeración de aminoácidos en la figura 6 es únicamente con respecto a un dominio III humano, en lugar de la mostrada con respecto a la numeración del dominio III respecto a la SAH madura de longitud completa.

La figura 7 muestra que la fusión de SAH a una IgG que es de tipo silvestre aumenta la persistencia en suero hasta un nivel similar al observado para la variante IgG-YTE. El % de la muestra inyectada que permanece en el suero se representa a lo largo del tiempo (de 1 a 240 horas).

La figura 8 representa los mapas plasmídicos de los vectores con entrada en la colección de presentación en superficie celular de scFv-Fc. El panel A representa el mapa plasmídico del vector pENDisplay que contiene un casete scFv Fc-GPI-anclaje unido de forma funcional a un promotor (en esta ocasión un promotor de CMV) y que termina con la secuencia poliA (en esta ocasión la secuencia poliA de BGH). La parte scFv está flanqueada por los sitios de las enzimas de restricción Sfi I y Not I para facilitar la clonación de diversas secuencias scFv. Los sitios attL1 y attL2 flanquean el casete de expresión scFv-GPI-anclaje. El panel B representa el mapa plasmídico del vector pENDisplay-OriP que se basa en el vector mostrado en el panel A, pero que incorpora la secuencia OriP (véase la figura 9C) después de la cola poliA del casete scFv-Fc-GPI-anclaje.

La figura 9 proporciona una representación de EBNA-1 y OriP. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos para un EBNA-1 se proporcionan en los paneles A y B, respectivamente. La secuencia de un OriP se proporciona en el panel C.

La figura 10 proporciona un esquema de un vector de expresión adenovírico genérico representativo para la expresión de una o más proteínas de interés. El vector representado incluye: una secuencia de ADN de interés que codifica una o más proteínas de interés; una secuencia OriP y opcionalmente una región codificante EBNA-1. Estos componentes están opcionalmente flanqueados por los sitios de recombinación att que también pueden usarse para la construcción del vector. Estos componentes están flanqueados en una lado por un genoma adenovírico, en este caso que tiene una eliminación del gen E1 y/o E3 o por una secuencia ITR. Las secuencias ITR 3' y 5' están indicadas. El vector también proporciona secuencias para la replicación (por ejemplo, origen de *E. coli* y selección por antibiótico (por ejemplo, resistencia a ampicilina) en una célula bacteriana para facilitar la construcción, la propagación y la selección, estos componentes están ubicados de manera que no se incorporarán en el adenovirus rescatado.

La figura 11 muestra que la SAH presentada en la superficie de células de mamífero (células 293F) retiene la capacidad de unión a FcRn. El panel A representa la construcción de expresión de mamífero denominada pEN-SAH-

GPI que comprende un promotor de CMV (línea gruesa), una secuencia señal (línea discontinua borrosa), una marca Flag N-terminal (línea discontinua delgada), conectores (G₄S)₃ (línea continua delgada) que flanquean la parte de SAH (recuadro sombreado) y la secuencia DAF-GPI. El panel B representa la detección por citometría de flujo de SAH sobre la superficie de células 293-F infectadas con adenovirus generado a partir de pEN-SAH-GPI después de 16 y 24 horas, o un plásmido de control que codifica una proteína de fusión scFv-Fc de control usando anticuerpo anti-SAH conjugado con FITC (panel A). Los paneles C y D representan la unión de FcRn humano biotinilado (25 µg/ml y 5 µg/ml, respectivamente) a SAH presentada en las células 293F visualizadas por ficoeritrina antiestreptavidina usando citometría de flujo. Los experimentos se expresan como histogramas de intensidad de fluorescencia (escala logarítmica) frente a la cantidad de células.

La figura 12 muestra cambios en los perfiles de unión de FcRn humano biotinilado con SAH de tipo silvestre (SAH-wt) y las dos colecciones de mutantes de SAH (SAH-DIII-lib1 y SAH-DIII-lib2) presentadas en células 293F. El panel A representa la detección por citometría de flujo de SAH sobre la superficie de células 293-F infectadas con colecciones de SAH-DIII de tipo silvestre y mutantes. El panel B representa la detección por citometría de flujo de FcRn humano biotinilado unido a SAH sobre la superficie celular visualizado por ficoeritrina antiestreptavidina. Los experimentos se expresan como histogramas de intensidad de fluorescencia (escala logarítmica) frente a la cantidad de células.

La figura 13 muestra los perfiles de clasificación por FACS de células que expresan SAH de tipo silvestre (SAH-wt, panel A) y las dos colecciones de mutantes de SAH (SAH-DIII-lib1 y SAH-DIII-lib2, paneles B y C, respectivamente) teñidas con FcRn humano biotinilado (10 µg/ml) detectado con ficoeritrina antiestreptavidina.

La figura 14 muestra los cambios en los perfiles de unión de FcRn humano biotinilado a células 293F que expresan en su superficie celular SAH de tipo silvestre (SAH-wt), la colección de mutantes SAH-DIII-lib1 antes de la clasificación y después de una primera y segunda rondas de clasificación. El panel A representa la detección por citometría de flujo de SAH sobre la superficie de células 293F que expresan el tipo silvestre, la SAH-DIII-lib1 antes de la clasificación y después de una primera y segunda rondas de clasificación. Los paneles B y C representan la unión de FcRn humano biotinilado (1 µg/ml y 0,1 µg/ml, respectivamente) al mismo conjunto de células visualizado por ficoeritrina antiestreptavidina usando citometría de flujo. Los experimentos se expresan como histogramas de intensidad de fluorescencia (escala logarítmica) frente a la cantidad de células.

La figura 15 muestra que la unión de FcRn a SAH mutante presentada sobre la superficie celular es de dependiente del pH. Los paneles A y B muestran la detección por citometría de flujo de FcRn humano biotinilado detectado con ficoeritrina antiestreptavidina en la superficie de células 293F que expresan una proteína de fusión scFv-Fc de control, SAH de tipo silvestre y tres mutaciones representativas (véase la tabla 5) a pH 5,5 (0,1 µg/ml de FcRn, panel A) y pH 7,2 (10 µg/ml, panel B). El panel C muestra la detección de citometría de flujo de SAH sobre la superficie de estas células usando anticuerpo anti-SAH conjugado con FITC.

La figura 16 muestra que las mutaciones de SAH más aisladas tienen mayor afinidad por FcRn medida por citometría de flujo. Se analizó la SAH de tipo silvestre y un panel de mutantes seleccionados para la unión a FcRn humano biotinilado a diferentes concentraciones por citometría de flujo. Los datos se representan como IFM sobre la concentración de FcRn.

La figura 17 representa la ubicación de varias variantes sobre la estructura resuelta de SAH (n.º de acceso a PDB 1BM0). El grueso de la estructura se representa como un diagrama de cintas con los restos L463, E495, T508, I523 y K534 representados por varillas e indicados con flechas. Los bucles 6 y 7 y las hélices 7 y 8 que abarcan los restos 492-536 están rodeados con un círculo. La mayoría de los puntos calientes y los puntos preferidos se encuentran en esta región.

4. Descripción detallada de la invención

4.1 Introducción

El receptor Fc neonatal (FcRn) prolonga la vida tanto de IgG como de seroalbúmina humana (SAH), por un mecanismo dependiente del pH, uniéndose específicamente a ambas moléculas al pH ácido del endosoma y reciclándolas de nuevo a la superficie celular, desviando de este modo ambas moléculas de la ruta de degradación lisosómica por defecto. Se ha demostrado que la capacidad de unión a FcRn es intrínseca al dominio III de albúmina. Como se demuestra en este documento, la adición del fragmento de unión a FcRn de SAH puede usarse para aumentar la semivida en suero de una proteína y/o la afinidad de unión a FcRn de agentes terapéuticos tales como anticuerpos, alternativas de anticuerpo, proteínas, esqueletos proteínicos y péptidos. En particular, como se demuestra en este documento, la afinidad de unión a FcRn a pH ácido (por ejemplo, pH de aprox. 5,5) se aumenta mientras que la afinidad a pH neutro (por ejemplo a pH de aprox. 7,4) no se altera sustancialmente. Los polipéptidos quiméricos que comprenden las variantes del dominio de unión a FcRn de la divulgación pueden aumentar la semivida en suero o la afinidad de unión a FcRn de la proteína incluso más que el dominio de unión a FcRn de tipo silvestre. Los polipéptidos variantes de SAH de la invención pueden servir como esqueletos para la unión a una diana terapéutica o pueden acoplarse a gentes terapéuticos.

La divulgación proporciona variantes del dominio III. Dichas variantes del dominio III pueden usarse en solitario o pueden usarse en el contexto de una secuencia de SAH adicional para aumentar la semivida en suero y/o la afinidad de unión a FcRn de una proteína heterólogo y/o un agente no proteínico.

5 Los polipéptidos quiméricos y variantes de SAH divulgados en este documento tienen numerosos usos. Se aprecia que las proteínas y otras moléculas a veces se eliminan del organismo humano o el organismo de un animal de forma relativamente rápida. La rápida eliminación puede socavar la capacidad de estudiar las proteínas y otras moléculas en modelos animales y pueden socavar la capacidad de usarlas de forma eficaz con fines terapéuticos. En algunos casos, una proteína se elimina tan rápidamente que no tiene efecto terapéutico. En otros casos, una
10 proteína se elimina a una tasa que necesita una frecuente dosificación. La frecuente dosificación aumenta los costes asociados con los tratamientos, y también aumenta el riesgo de incumplimiento con un régimen terapéutico. En algunos casos, una proteína se elimina a una tasa que necesita administrar una dosis mayor. Las dosis mayores de un agente activo pueden aumentar el riesgo de efectos secundarios, incluyendo reacciones inmunitarias.

15 Los polipéptidos quiméricos y polipéptidos de SAH variantes de la presente divulgación ayudan a abordar los problemas asociados con la eliminación rápida o relativamente rápida de proteínas aumentando la semivida en suero y/o la afinidad con FcRn. Asimismo, puede conjugarse un agente no proteínico a polipéptidos de SAH variantes de la presente divulgación para aumentar la semivida en suero y/o la afinidad por FcRn.

20 4.2 Terminología

Antes de continuar describiendo la presente invención en mayor detalle, debe entenderse que esta invención no está limitada a las composiciones o etapas del proceso específicas, ya que estas pueden variar. Debe apreciarse que,
25 como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, la forma singular "uno", "una" y "el" o "la" incluyen referente plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que se refiere esta invención. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2.^a ed., 2002, CRC Press;
30 The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3.^a ed., 1999, Academic Press; y el Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, revisado, 2000, Oxford University Press, proporcionan al experto un diccionario general de muchos de los términos usados en esta invención.

Los aminoácidos pueden mencionarse en este documento por sus símbolos de tres letras habitualmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Los nucleótidos, asimismo, se pueden mencionar por sus códigos de una letra habitualmente aceptados. Como se usa en este documento "sustitución de aminoácido" significa el remplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica precursora con otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución L463N se refiere a un polipéptido variante en que la leucina en la posición 463 está remplazada con asparagina.

La numeración de los aminoácidos en el dominio variable, la región determinante de complementariedad (CDR) y las regiones flanqueantes (FR), de un anticuerpo sigue, salvo que se indique lo contrario, la definición de Kabat expuesta en Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento o inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una única inserción de aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, los restos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto 82 de FR de la cadena pesada. La numeración de Kabat de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineación en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "convencional". La alineación máxima de los restos flanqueantes frecuentemente requiere la inserción de restos "espaciadores" en el sistema de numeración, a usar para la región Fv. Además, la identidad de determinados restos individuales en cualquier número de sitio Kabat dado puede variar de una cadena de anticuerpo a otra debido a divergencia entre especies o alélica.

Como se usa en este documento, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos", también conocidos como inmunoglobulinas, abarca anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos formados a partir de al menos dos fragmentos de unión a epítopos diferentes (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos camelizados, anticuerpos quiméricos, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de un dominio, anticuerpos de dominio, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos de anticuerpo que muestran la actividad biológica deseada (por ejemplo, la parte de unión a antígeno), Fv unidos por disulfuro (dsFv) y anticuerpos antiidiotipo (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id contra anticuerpos de la invención), intracuerpos y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen al menos un sitio de unión a antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), subisotipo (por

ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o alotipo (por ejemplo, Gm, por ejemplo, G1m(f, z, a o x), G2m(n), G3m(g, b, o c), Am, Em, y Km(1, 2 o 3)). Los anticuerpos pueden obtenerse de cualquier mamífero, incluyendo, aunque sin limitación, seres humanos, monos, cerdos, caballos, conejos, perros, gatos, ratones, etc., u otros animales tales como aves (por ejemplo, pollos).

Como se usa en este documento, la expresión "SAH de longitud completa" se refiere a la proteína seroalbúmina humana de longitud completa madura o a una secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína. La proteína SAH de longitud completa es de aproximadamente 585 aminoácidos (después de la eliminación de la pro- y preprosecuencia del extremo N). La proteína SAH de longitud completa madura (también mencionada como SAH madura de longitud completa) se expone en la SEQ ID NO: 2. En determinadas realizaciones, la SAH de longitud completa se refiere a la forma de longitud completa madura de SAH sin prosecuencias. La secuencia de prepro-SA (antes de la eliminación de las pro y preprosecuencias del extremo N) es de 609 aminoácidos y se expone en el número de acceso de GenBank NP_000468. Además, la identidad de determinados restos individuales puede variar de los presentados en la SEQ ID NO: 2 debido a divergencia alélica. Las variaciones alélicas que se producen en el dominio III de SAH incluyen: R → C en el resto 410; K → E en el resto 466; E → K en el resto 479; D → N en el resto 494; E → K en el resto 501; E → K en el resto 505; V → M en el resto 533; K → E en el resto 536; K → E en el resto 541; D → A o D → G en el resto 550; K → E en el resto 560; D → N en el resto 563; E → K en el resto 565; E → K en el resto 570; K → E en el resto 573; K → E en el resto 574; GKKLVAASQAALGL → PTMRIRERK en los restos 572-585; y LVAASQAALGL → TCCCKSSCLRLITSHLKASQ PTMRIRERK 575-585, numerados respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa.

Como se usa en este documento, la expresión "dominio III de SAH" se refiere al dominio III convencional de SAH que abarca los aminoácidos 381-585 de la SAH madura de longitud completa, de aproximadamente 205 aminoácidos, o una secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína. El dominio III de SAH también se abrevia en este documento como dominio III o simplemente DIII. La secuencia de aminoácidos para el polipéptido del dominio III se expone en la SEQ ID NO: 1. Como se indica anteriormente, la identidad de determinados restos individuales puede variar de los presentados en la SEQ ID NO: 1 debido a divergencia alélica.

Como se usa en este documento, la expresión "polipéptido quimérico" se refiere a un polipéptido que comprende al menos dos partes que no son heterólogas una con respecto a la otra. Por ejemplo, Un polipéptido quimérico, también mencionado como polipéptido de fusión o proteína de fusión, comprende al menos una parte de SAH unida a una parte de proteína heteróloga. La parte de SAH y la parte de proteína heteróloga pueden ser en sí mismas fusiones a, por ejemplo, Fc u otros restos. La parte de SAH y la parte de proteína heteróloga pueden unirse mediante interacciones covalentes o no covalentes. A modo de ejemplo, la parte de SAH y la parte de proteína heteróloga pueden conjugarse químicamente entre sí o pueden fusionarse de forma recombinante (por ejemplo, fusión traduccional en fase).

Como se usa en este documento, la expresión "proteína heteróloga" se refiere a la totalidad o una parte de una proteína que no es SAH. Aunque la expresión genérica "proteína heteróloga" se usa en este documento, la expresión pretende abarcar péptidos bioactivos de longitudes variables, así como proteínas de longitud completa o sustancialmente completa, incluyendo anticuerpos y fragmentos de anticuerpo. Las proteínas heterólogas preferidas pueden usarse y estudiarse con fines terapéuticos. Las clases ejemplares de proteínas heterólogas incluyen, aunque sin limitación, enzimas, citocinas y factores de crecimiento.

Como se usa en este documento, los polipéptidos SAH incluyen diversos fragmentos bioactivos y variantes, proteínas de fusión y formas modificadas del polipéptido SAH de tipo silvestre. Dichos fragmentos bioactivos o variantes, proteínas de fusión y formas modificadas de los polipéptidos SAH tienen al menos una parte de la secuencia de aminoácidos de identidad de secuencia sustancial con la proteína SAH natural, y retienen al menos la actividad de unión a FcRn de la proteína SAH natural. En determinadas realizaciones, un fragmento bioactivo, variante o proteína de fusión de un polipéptido SAH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a un polipéptido SAH. Como se usa en este documento, se entiendo que "fragmentos" incluyen fragmentos bioactivos o variantes bioactivas que muestran actividad de unión a FcRn. Los fragmentos bioactivos adecuados pueden usarse para generar polipéptidos quiméricos, y dichos polipéptidos quiméricos pueden usarse en cualquiera de los métodos descritos en este documento.

Como se usa en este documento, los términos "mutado", "mutante" y similares se refieren a una molécula, en particular una polipéptido SAH, que ha experimentado eliminación, adición o sustitución de uno o más aminoácidos usando técnicas bien conocidas para mutagénesis dirigida al sitio o cualquier otro método convencional.

4.3 Dominio III de SAH

En este documento se divulga un polipéptido variante de seroalbúmina humana (SAH), que comprende el dominio III de SAH o un fragmento de unión al receptor Fc neonatal (FcRn) del mismo, en el que dicho polipéptido variante puede unirse a un FcRn y en el que dicho dominio III de SAH comprende de una a dieciocho sustituciones de aminoácido para aumentar la semivida en suero o para aumentar la afinidad de dicho polipéptido variante por FcRn respecto a un polipéptido de SAH de control que carece de dichas sustituciones de aminoácido.

Las una a dieciocho sustituciones de aminoácido pueden aumentar la afinidad del polipéptido variante de SAH por FcRn. Las una a dieciocho sustituciones de aminoácido pueden aumentar la semivida en suero del polipéptido variante de SAH. Las una a dieciocho sustituciones de aminoácido pueden aumentar tanto la afinidad del polipéptido variante de SAH por FcRn como la semivida en suero del polipéptido variante de SAH. Las una a dieciocho sustituciones de aminoácido pueden aumentar la afinidad del polipéptido variante de SAH por FcRn a pH ácido (por ejemplo, pH de aprox. 5,5). Las una a dieciocho sustituciones de aminoácido pueden aumentar la afinidad del polipéptido variante de SAH por FcRn a pH ácido (por ejemplo, pH de aprox. 5,5), pero no alteran sustancialmente la afinidad del polipéptido variante de SAH por FcRn a pH neutro (por ejemplo, pH de aprox. 7,4).

En determinadas realizaciones, la variante de SAH como se define anteriormente se une a FcRn y tiene una tasa de inactivación o una tasa de activación que difiere de las de dicho polipéptido SAH de control. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la variante de SAH como se define anteriormente se une a FcRn y tiene una tasa de activación más rápida y/o una tasa de inactivación más lenta. En otras realizaciones, la tasa de activación es más lenta y/o la tasa de inactivación es más rápida.

En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona polipéptidos quiméricos como se define anteriormente que incluyen una parte de SAH, que es una parte de SAH que comprende el dominio III o una parte de unión a FcRn del mismo, y una proteína heteróloga, en los que el polipéptido quimérico retiene una actividad funcional de la proteína heteróloga. En determinadas realizaciones, la parte de SAH comprende el polipéptido SAH completo o un fragmento bioactivo que comprende el dominio III de SAH, o un fragmento de unión al receptor Fc neonatal (FcRn) del mismo. En determinadas realizaciones, la parte de SAH comprende el dominio III de SAH o un fragmento de unión al receptor Fc neonatal (FcRn) del mismo y al menos una parte de otro dominio de SAH, por ejemplo, al menos una parte del dominio I de SAH o al menos una parte del dominio II de SAH, o al menos una parte de los dominios I y II de SAH. Como se usa en este documento, el dominio I de SAH comprende los restos 1-197; el dominio II de SAH comprende los restos 189-385; el dominio III de SAH comprende los restos 381-585 numerados respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa.

En este documento se divulga un polipéptido quimérico que tiene una o ambas de afinidad aumentada por FcRn y semivida en suero aumentada respecto a un polipéptido de control que no comprende la parte de SAH. El polipéptido quimérico puede tener afinidad aumentada por FcRn. El polipéptido quimérico puede tener una semivida en suero aumentada. El polipéptido quimérico puede tener tanto afinidad aumentada por FcRn como semivida en suero aumentada. El polipéptido quimérico puede tener afinidad aumentada por FcRn a pH ácido (por ejemplo, pH de aprox. 5,5). El polipéptido quimérico puede tener afinidad aumentada por FcRn a pH ácido (por ejemplo, pH de aprox. 5,5), la afinidad del polipéptido quimérico por FcRn a pH neutro (por ejemplo, pH de aprox. 7,4) no se altera sustancialmente.

Además, en este documento se describe el dominio III de la parte de SAH de un polipéptido (por ejemplo, variante de SAH o polipéptido quimérico) que incluye de una a dieciocho sustituciones de aminoácido para aumentar una o ambas de la afinidad por FcRn y semivida en suero del polipéptido quimérico respecto a un polipéptido quimérico de control en que la parte de SAH no incluye dichas sustituciones de aminoácido. Las una a dieciocho sustituciones de aminoácido divulgadas en este documento pueden aumentar la afinidad del polipéptido quimérico por FcRn. Las una a dieciocho sustituciones de aminoácido divulgadas en este documento pueden aumentar la semivida en suero del polipéptido quimérico. Las una a dieciocho sustituciones de aminoácido divulgadas en este documento pueden aumentar tanto la afinidad del polipéptido quimérico por FcRn como la semivida en suero del polipéptido quimérico.

En este documento se divulga el dominio III de la parte de SAH de un polipéptido (por ejemplo, polipéptido variante de SAH o polipéptido quimérico) que incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 sustituciones de aminoácido. Asimismo, en el contexto de polipéptidos variantes de SAH que comprenden el dominio III o una parte de unión a FcRn del mismo, el dominio III incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 sustituciones de aminoácido. En este documento se divulga una sustitución de aminoácido que no es únicamente la sustitución de un único aminoácido por otro resto presente en una variante alélica.

En este documento se divulga el dominio III de la parte de SAH de un polipéptido (por ejemplo, polipéptido variante de SAH o polipéptido quimérico) que incluye al menos una sustitución de aminoácido en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 381, resto 383, resto 391, resto 401, resto 402, resto 407, resto 411, resto 413, resto 414, resto 415, resto 416, resto 424, resto 426, resto 434, resto 442, resto 445, resto 447, resto 450, resto 454, resto 455, resto 456, resto 457, resto 459, resto 463, resto 495, resto 506, resto 508, resto 509, resto 511, resto 512, resto 515, resto 516, resto 517, resto 519, resto 521, resto 523, resto 524, resto 525, resto 526, resto 527, resto 531, resto 535, resto 538, resto 539, resto 541, resto 557, resto 561, resto 566, resto 569.

En este documento se divulga el dominio III de la parte de SAH de un polipéptido (por ejemplo, polipéptido variante de SAH o polipéptido quimérico) que comprende sustituciones de aminoácido en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: (a) restos 383 y 413; (b) restos 401 y 523; (c) restos 407 y 447; (d) restos 407 y 447 y 539; (e) restos 407 y 509; (f) restos 407 y 526; (g) restos 411 y 535; (h) restos 414 y 456; (i) restos 415 y 569; (j) restos 426 y 526; (k) restos 442 y 450 y 459; (l) restos

463 y 508; (m) restos 508 y 519 y 525; (n) restos 509 y 527; (o) restos 523 y 538; (p) restos 526 y 557; y (q) restos 541 y 561.

En este documento se divulga que la afinidad por FcRn y/o la semivida en suero aumentadas pueden evaluarse frente a un control diferente. Por ejemplo, las propiedades del polipéptido quimérico pueden evaluarse frente a las de la proteína heteróloga en ausencia de una parte de SAH o pueden evaluarse frente a las de la misma parte de SAH o una similar, en ausencia de las sustituciones de aminoácido y/o en ausencia de la proteína heteróloga. Asimismo, un polipéptido variante de SAH puede evaluarse frente al de una molécula de SAH que no tiene las sustituciones de aminoácido.

En este documento se divulga que el polipéptido quimérico/polipéptido variante de SAH se une a FcRn con una afinidad mayor que dicho polipéptido de control. En este documento se divulgan las una a dieciocho sustituciones de aminoácido que aumentan la afinidad del polipéptido quimérico/polipéptido variante de SAH por FcRn a pH ácido (por ejemplo, pH de aprox. 5,5). En este documento se divulgan las una a dieciocho sustituciones de aminoácido que aumentan la afinidad del polipéptido quimérico/polipéptido variante de SAH por FcRn a pH ácido (por ejemplo, pH de aprox. 5,5), pero no alteran sustancialmente la afinidad del polipéptido quimérico por FcRn a pH neutro (por ejemplo, pH de aprox. 7,4). En este documento se divulga un polipéptido quimérico que se une a FcRn con una afinidad mayor a pH ácido y tiene una semivida en suero aumentada.

El polipéptido quimérico/polipéptido variante de SAH de la invención puede unirse a FcRn y tiene una tasa de inactivación o una tasa de activación que difiere de la de dicho polipéptido de control. Por ejemplo, el polipéptido quimérico/polipéptido variante de SAH de la invención puede unirse a FcRn y tiene una tasa de activación más rápida y/o una tasa de inactivación más lenta. En otras realizaciones, la tasa de activación es más lenta y/o la tasa de inactivación es más rápida.

El dominio III de SAH de un polipéptido (por ejemplo, variante de SAH o polipéptido quimérico con una parte de SAH) puede comprender de una a diez sustituciones de aminoácido para aumentar la afinidad del polipéptido por FcRn y/o aumentar la semivida en suero del polipéptido respecto a un polipéptido de control en que la parte de SAH no incluye dichas sustituciones de aminoácido. El dominio III de SAH puede comprender una sustitución de aminoácido. El dominio III de SAH puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácido. También se divulga en este documento un dominio III de SAH que comprende 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 sustituciones de aminoácido. El dominio III de SAH puede comprender al menos una sustitución de aminoácido. El dominio III de SAH puede comprender al menos diez sustituciones de aminoácido.

Las sustituciones de aminoácido ejemplares incluyen: (i) remplazo con alanina; (ii) sustitución conservativa de aminoácido; (iii) sustitución no conservativa de aminoácido. La divulgación contempla que todas la sustituciones de aminoácido en el dominio III de un polipéptido dado (puede ser un miembro de una de estas categorías de sustitución), y también contempla que cada sustitución de aminoácido en el dominio III de un polipéptido dado (por ejemplo, variante de SAH y polipéptido quimérico con una parte de SAH) puede seleccionarse de forma individual e independiente de estas categorías.

Una sustitución (al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc. sustituciones del dominio III de SAH) puede ser de un resto en SAH a alanina. Una sustitución (al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc. sustituciones del dominio III de SAH) puede remplazar un resto de aminoácido neutro dado en SAH con otro resto de aminoácido neutro. Una sustitución (al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc. sustituciones del dominio III de SAH) puede remplazar un resto de aminoácido ácido dado en SAH con otro resto de aminoácido ácido. Una sustitución (al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc. sustituciones del dominio III de SAH) puede remplazar un resto de aminoácido básico dado en SAH con otro resto de aminoácido básico. La divulgación contempla realizaciones en las que cada sustitución se elige independientemente entre las clases anteriores de sustituciones. Los polipéptido (por ejemplo, variantes de SAH y polipéptidos quiméricos con una parte de SAH) que comprenden cualquier combinación de las categorías anteriores de sustituciones se contemplan específicamente.

Una sustitución (al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc. sustituciones del dominio III de SAH) puede remplazar un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: lisina (K; Lys), arginina (R; Arg); histidina (H; His). Una sustitución (al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc. sustituciones del dominio III de SAH) puede remplazar un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: aspartato (D; Asp; ácido aspártico) y glutamato (E; Glu; ácido glutámico). Una sustitución (al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc. sustituciones del dominio III de SAH) puede remplazar un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: asparagina (N; Asn), glutamina (Q; Gln), serina (S; Ser), treonina (T; Thr) y tirosina (Y; Tyr). Una sustitución (al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc. sustituciones del dominio III de SAH) puede remplazar un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: alanina (A; Ala), valina (V; Val), isoleucina (I; Ile), leucina (L; Leu), prolina (P; Pro), fenilalanina (F; Phe), triptófano (W; Trp), metionina (M; Met), cisteína (C; Cys) y glicina (G; Gly). Una sustitución (al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc. sustituciones del dominio III de SAH) puede remplazar un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: fenilalanina, triptófano y tirosina. Una sustitución (al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc. sustituciones del dominio III de SAH) puede remplazar un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: cisteína, serina y treonina. Una sustitución (al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc. sustituciones del dominio III de SAH) puede remplazar un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato. Una sustitución (al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc. sustituciones del dominio III de SAH) puede remplazar un aminoácido con

otro dentro del siguiente grupo: glicina, serina, treonina, alanina, valina, leucina e isoleucina. La divulgación contempla realizaciones en las que dicha sustitución se elige independientemente entre las categorías anteriores de sustituciones. Los polipéptidos (por ejemplo, variantes de SAH y polipéptidos quiméricos con una parte de SAH) que comprenden cualquier combinación de las clases anteriores de sustituciones se contemplan específicamente.

5 En este documento se divulga el dominio III de la parte de SAH de un polipéptido (por ejemplo, polipéptido variante de SAH o polipéptido quimérico) que tiene afinidad aumentada por FcRn y/o semivida en suero aumentada y que incluye al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en: V381N, V381Q, E383A, E383G, E383I, E383L, E383V, N391A, N391G, N391I, N391L, N391V, Y401D, Y401E, K402A, K402G, K402I, K402L, K402V, L407F, L407N, L407Q, L407W, L407Y, Y411Q, Y411N, K413C, K413S, K413T, K414S, K414T, V415C, V415S, V415T, Q416H, Q416P, V424A, V424G, V424I, V424L, V424N, V424Q, V426D, V426E, V426H, V426P, G434C, G434S, G434T, E442K, E442R, R445F, R445W, R445Y, P447S, P447T, E450D, E450E, S454C, S454M, S454T, V455N, V455Q, V456N, V456Q, L457F, L457W, L457Y, Q459K, Q459R, L463N, L463Q, E495D, T506F, T506W, T506Y, T508K, T508R, T508S, F509C, F509I, F509L, F509M, F509V, F509W, F509Y, A511F, A511W, A511Y, D512F, D512W, D512Y, T515C, T515H, T515N, T515P, T515Q, T515S, L516F, L516S, L516T, L516W, L516Y, S517C, S517F, S517M, S517T, S517W, S517Y, K519A, K519G, K519I, K519L, K519W, R521F, R521W, R521Y, I523A, I523D, I523E, I523F, I523G, I523I, I523K, I523L, I523N, I523Q, I523R, I523V, I523W, I523Y, K524A, K524G, K524I, K524L, K524V, K525A, K525G, K525I, K525L, K525V, Q526C, Q526M, Q526S, Q526T, Q526Y, T527F, T527W, T527Y, E531A, E531G, E531I, E531L, E531V, H535D, H535E, H535P, K538F, K538W, K538Y, A539I, A539L, A539V, K541F, K541W, K541Y, K557A, K557G, K557I, K557L, K557V, A561F, A561W, A561Y, T566F, T566W, T566Y, A569H y A569P. Más de una sustitución de aminoácido (por ejemplo, 2, 3, 4, 5...) o incluso todas las sustituciones de aminoácido en el dominio III pueden seleccionarse de las sustituciones anteriores.

25 En este documento se divulga el dominio III de la parte de SAH de un polipéptido (por ejemplo, polipéptido variante de SAH o polipéptido quimérico) que incluye al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en: V381N, E383G, N391V, Y401E, K402A, L407N, L407Y, Y411Q, K414S, K413S, V415T, V415C, Q416P, V424I, V424Q, V426E, V426H, G434C, E442K, R445W, P447S, E450D, S454C, V455N, V456N, L457F, Q459R, L463N, E495D, T506Y, T508R, T508S, F509I, F509M, F509W, A511F, D512Y, T515Q, L516T, L516W, S517W, R521W, I523D, I523E, I523G, I523K, I523L, I523N, I523Q, I523R, I523V, I523W, I523Y, K524A, K524G, K524I, K524L, K524V, K525A, K525G, K525I, K525L, K525V, Q526C, Q526M, Q526S, Q526T, Q526Y, T527F, T527W, T527Y, E531I, H535N, H535P, K538Y, A539I, K541F, K557G, A561F, T566W y A569P. Más de una sustitución de aminoácido (por ejemplo, 2, 3, 4, 5...) o incluso todas las sustituciones de aminoácido en el dominio III pueden seleccionarse de las sustituciones anteriores.

35 En este documento se divulga el dominio III de la parte de SAH de un polipéptido (por ejemplo, polipéptido variante de SAH o polipéptido quimérico) que incluye al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en: L407N, L407Y, V415T, V424I, V424Q, V426E, V426H, P447S, V455N, V456N, L463N, E495D, T506Y, T508R, F509M, F509W, A511F, D512Y, T515Q, L516T, L516W, S517W, R521W, I523D, I523E, I523G, I523K, I523R, K524L, Q526M, T527Y, H535P y K557G. Más de una sustitución de aminoácido (por ejemplo, 2, 3, 4, 5...) o incluso todas las sustituciones de aminoácido en el dominio III pueden seleccionarse de las sustituciones anteriores.

40 En este documento se divulga el dominio III de la parte de SAH de un polipéptido (por ejemplo, polipéptido variante de SAH o polipéptido quimérico) que incluye al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en: L407Y, V415T, V424I, V424Q, P447S, V455N, V456N, L463N, E495D, T506Y, T508R, S517W, I523D, I523E, I523G, I523K, I523R, K524L, Q526M, T527Y, H535P y K557G. Más de una sustitución de aminoácido (por ejemplo, 2, 3, 4, 5...) o incluso todas las sustituciones de aminoácido en el dominio III pueden seleccionarse de las sustituciones anteriores.

45 En este documento se divulga el dominio III de la parte de SAH de un polipéptido (por ejemplo, polipéptido variante de SAH o polipéptido quimérico) que incluye sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH seleccionadas del grupo que consiste en: (a) E383G/K413S; (b) Y401E/I523G; (c) L407N/P447S; (d) L407N/P447S/A539I; (e) L407N/F509M; (f) L407Y/Q526T; (g) Y411Q/H535N; (h) K414S/V456N; (i) V415T/A569P; (j) V426H/Q526Y; (k) E442K/E450D/Q459R; (l) L463N/T508R; (m) T508R/K519I/K525V; (n) F509I/T527Y; (o) I523Q/K538Y; (p) Q526M/K557G; y (q) K541F/A561F. Más de una sustitución de aminoácido (por ejemplo, 2, 3, 4, 5...) o incluso todas las sustituciones de aminoácido en el dominio III divulgadas en este documento pueden seleccionarse de las sustituciones anteriores.

50 En este documento se divulga el dominio III de la parte de SAH de un polipéptido (por ejemplo, polipéptido variante de SAH o polipéptido quimérico) que incluye sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH seleccionadas del grupo que consiste en: (a) L407N/P447S; (b) L407N/P447S/A539I; (c) L407N/F509M; (d) Y411Q/H535N; (e) K414S/V456N; (f) V426H/Q526Y; (g) L463N/T508R; (h) F509I/T527Y; (i) I523Q/K538Y; (j) Q526M/K557G; y (k) K541F/A561F.

60 Además, los fragmentos o variantes pueden sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas en la técnica tales como química de f-Moc o t-Boc en fase sólida de Merrifield convencional. Los fragmentos o variantes pueden producirse (de forma recombinante por síntesis química) y ensayarse para identificar aquellos fragmentos o

variantes que pueden funcionar tan bien como o de forma sustancialmente similar a una proteína SAH natural, por ejemplo.

5 En determinadas realizaciones, la presente invención contempla modificar la estructura de un polipéptido SAH para fines tales como potenciar a eficacia terapéutica o profiláctica, o la estabilidad (por ejemplo, semivida en suero, vida útil *ex vivo* y resistencia a degradación proteolítica *in vivo*). Dichos polipéptidos SAH modificados tienen la misma o sustancialmente la misma bioactividad que el polipéptido SAH de origen natural (es decir, natural o de tipo silvestre). Los polipéptidos SAH modificados pueden conjugarse con otros restos terapéuticos (por ejemplo, proteínas y agentes no proteínicos) como se describe en este documento. Los polipéptidos modificados pueden producirse, por ejemplo, por sustitución, eliminación o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar, por ejemplo, que un remplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina o un remplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado (por ejemplo, sustituciones conservativas de aminoácido) no tengan un efecto principal sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Los remplazos conservativos son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales.

En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está conservado entre múltiples especies. En determinadas realizaciones, todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos que están conservados entre múltiples especies. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo. En determinadas realizaciones, todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos que están conservados entre proteínas seroalbúmina de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de especies altamente conservadas respecto a seres humanos, tales como simios y monos. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de animales que no son mamíferos. En determinadas realizaciones, toda estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de especies altamente conservadas respecto a seres humanos, tales como simios y monos. En determinadas realizaciones, toda estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de animales que no son mamíferos. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de una mayoría de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de al menos dos especies seleccionadas del grupo que consiste en ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de al menos tres especies seleccionadas del grupo que consiste en ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de al menos cuatro especies seleccionadas del grupo que consiste en ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de al menos cinco especies seleccionadas del grupo que consiste en ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de entre dos y cinco especies seleccionadas del grupo que consiste en ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo.

En determinadas realizaciones, todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de una mayoría de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo. En determinadas realizaciones, todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de al menos dos especies seleccionadas del grupo que consiste en ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo. En determinadas realizaciones, todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de al menos tres especies seleccionadas del grupo que consiste en ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo. En determinadas realizaciones, todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de al menos cuatro especies seleccionadas del grupo que consiste en ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo. En determinadas realizaciones, todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de al menos cinco especies seleccionadas del grupo que consiste en ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo. En determinadas realizaciones, todas estas sustituciones de

aminoácido en el dominio III de SAH son de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de entre dos y cinco especies seleccionadas del grupo que consiste en ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo. Los polipéptidos (por ejemplo, variantes de SAH y polipéptidos quiméricos) que comprenden cualquier combinación de las categorías anteriores de sustituciones de aminoácido también están contemplados.

En este documento se divulga al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 383, resto 389, resto 391, resto 410, resto 417, resto 425, resto 442, resto 465, resto 467, resto 468, resto 486, resto 499, resto 502, resto 520, resto 532, resto 536, resto 543 y resto 571. En este documento se divulga al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 417, resto 442, resto 499 y resto 502. En este documento se divulga al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 392, resto 399, resto 403, resto 411, resto 412, resto 414, resto 416, resto 418, resto 420, resto 423, resto 434, resto 437, resto 438, resto 445, resto 448, resto 450, resto 453, resto 461, resto 476, resto 477, resto 484, resto 485, resto 487, resto 488, resto 494, resto 497, resto 507, resto 509, resto 514, resto 529, resto 534, resto 537, resto 540, resto 551, resto 558, resto 559, resto 567, resto 568, resto 572. Más de una sustitución de aminoácido (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18) o incluso todas las sustituciones de aminoácido en el dominio III divulgadas en este documento pueden estar en los restos anteriores. Se divulgan polipéptidos (por ejemplo, variantes de SAH y polipéptidos quiméricos) que comprenden todas las combinaciones de sustituciones de aminoácido en uno cualquiera o más de los restos anteriores.

En este documento se divulga al menos una de las sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en el dominio III de SAH madura de longitud completa: resto 383, resto 391, resto 411, resto 414, resto 416, resto 434, resto 442, resto 445, resto 450 y resto 509.

En este documento se divulga al menos una de las sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH seleccionadas del grupo que consiste en: E383A, E383G, E383I, E383L, E383V, N391A, N391G, N391I, N391L, N391V, Y411Q, Y411N, K414S, K414T, Q416H, Q416P, G434C, G434S, G434T, E442K, E442R, R445F, R445W, R445Y, E450D, E450E, F509C, F509I, F509L, F509M, F509V, F509W y F509Y. Más de una sustitución de aminoácido (por ejemplo, 2, 3, 4, 5...) o incluso todas las sustituciones de aminoácido en el dominio III divulgadas en este documento pueden seleccionarse de las sustituciones anteriores.

En este documento se divulga al menos una de las sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en el dominio III de SAH madura de longitud completa: resto 380, resto 381, resto 384, resto 387, resto 396, resto 401, resto 404, resto 405, resto 406, resto 409, resto 419, resto 421, resto 422, resto 424, resto 428, resto 430, resto 431, resto 433, resto 441, resto 457, resto 458, resto 463, resto 464, resto 466, resto 469, resto 470, resto 474, resto 475, resto 480, resto 481, resto 489, resto 491, resto 495, resto 500, resto 508, resto 510, resto 515, resto 516, resto 524, resto 525, resto 526, resto 528, resto 531, resto 535, resto 539, resto 544, resto 547, resto 576. Más de una sustitución de aminoácido (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18) o incluso todas las sustituciones de aminoácido en el dominio III divulgadas en este documento pueden estar en los restos anteriores. Se divulgan polipéptidos (por ejemplo, variantes de SAH y polipéptidos quiméricos) que comprenden todas las combinaciones de sustituciones de aminoácido en uno cualquiera o más de los restos anteriores.

En este documento se divulga al menos una de las sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en el dominio III de SAH madura de longitud completa: resto 381, resto 401, resto 424, resto 457, resto 463, resto 495, resto 508, resto 515, resto 516, resto 524, resto 525, resto 526, resto 531, resto 535 y resto 539.

En este documento se divulga al menos una de las sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH seleccionadas del grupo que consiste en: V381N, V381Q, Y401D, Y401E, V242A, V242G, V424I, V424L, V424N, V424Q, V424V, L457F, L457W, L457Y, L463N, L463Q, E495D, T508K, T508R, T508S, T515C, T515H, T515N, T515P, T515Q, T515S, L516F, L516S, L516T, L516W, L516Y, K524A, K524G, K524I, K524L, K524V, K525A, K525G, K525I, K525L, K525V, Q526C, Q526M, Q526S, Q526T, Q526Y, E531A, E531G, E531I, E531L, E531V, H535D, H535E, H535P, A539I, A539L y A539V. Más de una sustitución de aminoácido (por ejemplo, 2, 3, 4, 5...) o incluso todas las sustituciones de aminoácido en el dominio III divulgadas en este documento pueden seleccionarse de las sustituciones anteriores.

En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que no está conservado entre múltiples especies. En determinadas realizaciones, todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos que no están conservados entre múltiple especies. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que no está conservado entre proteínas seroalbúmina de ser humano, rata, perro, conejo y vaca. En

determinadas realizaciones, todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos que no están conservados entre proteínas seroalbúmina de ser humano, rata, perro, conejo y vaca. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que no está conservado entre proteínas seroalbúmina de ser humano, rata, perro, conejo y vaca. En determinadas realizaciones, todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos que no están conservados entre proteínas seroalbúmina de ser humano, rata, perro, conejo y vaca. También se contemplan polipéptidos (por ejemplo, variantes de SAH y polipéptidos quiméricos con una parte de SAH) que comprenden cualquier combinación de la categoría anterior de sustituciones de aminoácidos.

En este documento se divulga al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 382, resto 385, resto 390, resto 397, resto 400, resto 402, resto 415, resto 429, resto 432, resto 435, resto 439, resto 440, resto 443, resto 444, resto 446, resto 447, resto 459, resto 471, resto 472, resto 478, resto 479, resto 483, resto 490, resto 492, resto 493, resto 503, resto 511, resto 517, resto 518, resto 519, resto 521, resto 538, resto 541, resto 542, resto 546, resto 549, resto 550, resto 552, resto 554, resto 556, , resto 560, resto 562, resto 563, resto 565 y resto 566. Más de una sustitución de aminoácido (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18) o incluso todas las sustituciones de aminoácido en el dominio III divulgadas en este documento pueden estar en los restos anteriores. Se divulgan polipéptidos (por ejemplo, variantes de SAH y polipéptidos quiméricos con una parte de SAH) que comprenden cualquier combinación de sustituciones de aminoácido en uno cualquiera o más de los restos anteriores.

En este documento se divulga al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH que está en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 402, resto 415, resto 447, resto 459, resto 511, resto 517, resto 519, resto 521, resto 538, resto 541 y resto 566.

En este documento se divulga al menos una de las sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH seleccionadas del grupo que consiste en: K402A, K402G, K402I, K402L, K402V, V415C, V415S, V415T, P447S, P447T, Q459K, Q459R, L463N, L463Q, A511F, A511W, A511Y, S517C, S517F, S517M, S517T, S517W, S517Y, K519A, K519G, K519I, K519L, K519V, R521F, R521W, R521Y, K538F, K538W, K538Y, K541F, K541W, K541Y, T566F, T566W y T566Y. Más de una sustitución de aminoácido (por ejemplo, 2, 3, 4, 5...) o incluso todas las sustituciones de aminoácido en el dominio III divulgadas en este documento pueden seleccionarse de las sustituciones anteriores.

En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto accesible en la superficie. En determinadas realizaciones, todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos accesibles en la superficie. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está tanto accesible en la superficie como conservado entre múltiples especies. En determinadas realizaciones, todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos que están tanto accesibles en la superficie como conservados entre múltiple especies. En este documento se divulga al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 383, resto 389, resto 391, resto 410, resto 417, resto 425, resto 442, resto 465, resto 467, resto 468, resto 486, resto 499, resto 502, resto 520, resto 532, resto 536, resto 543 y resto 571. En este documento se divulga al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 417, resto 442, resto 499 y resto 502. En este documento se divulga al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 383, resto 391 y resto 442. Más de una sustitución de aminoácidos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18) o incluso todas las sustituciones de aminoácido en el dominio III divulgadas en este documento pueden estar en los restos anteriores. Se divulgan en este documento polipéptidos (por ejemplo, variantes de SAH y polipéptidos quiméricos) que comprenden cualquier combinación de las categorías anteriores de sustituciones de aminoácido. En este documento se divulga al menos una de las sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH seleccionadas del grupo que consiste en: E383A, E383G, E383I, E383L, E383V, N391A, N391G, N391I, N391L, N391V, E442K, E442R. Más de una sustitución de aminoácido (por ejemplo, 2, 3, 4, 5...) o incluso todas las sustituciones de aminoácido en el dominio III divulgadas en este documento pueden seleccionarse de las sustituciones anteriores.

La al menos una sustitución de aminoácidos en el dominio III de SAH divulgada en este documento puede no ser únicamente una sustitución de R410C; K466E; E479K; D494N; E501K; E505K; V533M; K536E536; K541E; D550A o D550G; K560E; D563N; E565K; E570K; K573E; o K574E.

En determinadas realizaciones, los polipéptidos (por ejemplo, variantes de SAH y polipéptidos quiméricos con una parte de SAH) de la presente invención comprenden un dominio III de SAH que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 % o al menos un 90 % idéntico a la SEQ ID NO: 1. El dominio III de SAH puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1; o al menos un 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 1. La parte de SAH puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 % o al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

85 % o al menos un 90 % idéntica a la parte correspondiente de la SEQ ID NO: 2; o al menos un 95 % idéntica a la parte correspondiente de la SEQ ID NO: 2; o al menos un 98 % idéntica a la parte correspondiente de la SEQ ID NO: 2.

5 La divulgación contempla que, además de una o más sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH, un polipéptido (por ejemplo, variantes de SAH y polipéptidos quiméricos con una parte de SAH) puede incluir una o más sustituciones de aminoácido en la parte de SAH fuera del dominio III.

10 La divulgación contempla que los polipéptidos (por ejemplo, variantes de SAH y polipéptidos quiméricos con una parte de SAH), además de una o más sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH, también pueden incluir una o más eliminaciones y/o inserciones de aminoácido (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) en el dominio III. Obsérvese que cuando una parte de SAH contiene una o más eliminaciones y/o inserciones de aminoácido, dichos restos insertados o eliminados pueden indicarse usando letras para no alterar la numeración del resto, respecto a la de la SAH natural. Por ejemplo, si un resto de aminoácido se insertó entre los restos 414 y 415, dicho resto podría indicarse como 414a. Los restos de aminoácido insertados pueden insertarse en un bucle accesible en la superficie para aumentar el tamaño de dicho bucle. Los restos de aminoácido insertados pueden insertarse en una hélice para aumentar el tamaño y/o alterar la estructura de dicha hélice.

20 Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en el bucle 2 del dominio III de SAH. Todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH pueden estar en el bucle 2 del dominio III de SAH. El dominio III de SAH puede comprender de una a cinco (1, 2, 3, 4, 5) sustituciones de aminoácido, en el que dichas de una a cinco sustituciones de aminoácido están en el bucle 2 del dominio III de SAH. El dominio III de SAH puede comprender de una a cinco (1, 2, 3, 4 o 5) sustituciones de aminoácido en el bucle 2 del dominio III de SAH, e incluir además una o más sustituciones de aminoácido adicionales en el dominio III de SAH que no están en el bucle 2. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en el bucle 3 del dominio III de SAH. Todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH pueden estar en el bucle 3 del dominio III de SAH. El dominio III de SAH puede comprender de una a cinco (1, 2, 3, 4, 5) sustituciones de aminoácido, en el que dichas de una a cinco sustituciones de aminoácido están en el bucle 3 del dominio III de SAH.

30 El dominio III de SAH puede comprender de una a cinco (1, 2, 3, 4 o 5) sustituciones de aminoácido en el bucle 3 del dominio III de SAH, e incluir además una o más sustituciones de aminoácido adicionales en el dominio III de SAH que no están en el bucle 3. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en el bucle 6 del dominio III de SAH. Todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH pueden estar en el bucle 6 del dominio III de SAH. El dominio III de SAH puede comprender de una a dieciocho (1, 2, 3, 4, 5, 6, etc.) sustituciones de aminoácido, en el que dichas de una a dieciocho sustituciones de aminoácido están en el bucle 6 del dominio III de SAH. El dominio III de SAH puede comprender de una a dieciocho (1, 2, 3, 4, 5, 6, etc.) sustituciones de aminoácido en el bucle 6 del dominio III de SAH, e incluir además una o más sustituciones de aminoácido adicionales en el dominio III de SAH que no están en el bucle 6. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en la hélice 7 del dominio III de SAH. Todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH pueden estar en la hélice 7 del dominio III de SAH. El dominio III de SAH puede comprender de una a seis (1, 2, 3, 4, 5 o 6) sustituciones de aminoácido, en el que dichas de una a seis sustituciones de aminoácido están en la hélice 7 del dominio III de SAH. El dominio III de SAH puede comprender de una a seis (1, 2, 3, 4, 5 o 6) sustituciones de aminoácido en la hélice 7 del dominio III de SAH, e incluir además una o más sustituciones de aminoácido adicionales en el dominio III de SAH que no están en la hélice 7. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en el bucle 7 del dominio III de SAH. Todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH pueden estar en el bucle 7 del dominio III de SAH.

50 El dominio III de SAH puede comprender de una a tres (1, 2, o 3) sustituciones de aminoácido, en el que dichas de una a tres sustituciones de aminoácido están en el bucle 7 del dominio III de SAH. El dominio III de SAH puede comprender de una a tres (1, 2, o 3) sustituciones de aminoácido en el bucle 7 del dominio III de SAH, e incluir además una o más sustituciones de aminoácido adicionales en el dominio III de SAH que no están en el bucle 7. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en la hélice 8 del dominio III de SAH. Todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH pueden estar en la hélice 8 del dominio III de SAH. El dominio III de SAH puede comprender de una a dieciocho (1, 2, 3, 4, 5, 6, etc.) sustituciones de aminoácido, en el que dichas de una a dieciocho sustituciones de aminoácido están en la hélice 8 del dominio III de SAH. El dominio III de SAH puede comprender de una a seis (1, 2, 3, 4, 5 o 6) sustituciones de aminoácido en la hélice 8 del dominio III de SAH, e incluir además una o más sustituciones de aminoácido adicionales en el dominio III de SAH que no están en la hélice 8. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en el bucle 8 del dominio III de SAH. Todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH pueden estar en el bucle 8 del dominio III de SAH. El dominio III de SAH puede comprender de una a cinco (1, 2, 3, 4, 5) sustituciones de aminoácido, en el que dichas de una a cinco sustituciones de aminoácido están en el bucle 8 del dominio III de SAH. El dominio III de SAH puede comprender de una a cinco (1, 2, 3, 4 o 5) sustituciones de aminoácido en el bucle 8 del dominio III de SAH, e incluir además una o más sustituciones de aminoácido adicionales en el dominio III de SAH que no están en el bucle 8. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en el bucle 9 del dominio III de SAH. Todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH pueden estar en el bucle 9 del dominio III de SAH. El dominio III de SAH puede

- comprender de una a cuatro sustitución de aminoácido, en el que dichas de una a cuatro (1, 2, 3, 4) sustituciones de aminoácido están en el bucle 9 del dominio III de SAH. El dominio III de SAH puede comprender de una a cinco (1, 2, 3, 4) sustituciones de aminoácido en el bucle 9 del dominio III de SAH, e incluir además una o más sustituciones de aminoácido adicionales en el dominio III de SAH que no están en el bucle 9. Como se detalla anteriormente, las potenciales sustituciones de aminoácido, independientemente en cada posición, se seleccionan de cualquiera de las clases de sustitución detalladas anteriormente (por ejemplo, alanina, sustitución conservativa, etc.). Los polipéptidos (por ejemplo, variantes de SAH y polipéptidos quiméricos) que comprenden cualquier combinación de las categorías anteriores de sustituciones de aminoácido también están contemplados.
- En determinadas realizaciones, dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH no están en el bucle 2 del dominio III de SAH. En determinadas realizaciones, dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH no están en el bucle 3 del dominio III de SAH. En determinadas realizaciones, dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH no están en el bucle 6 del dominio III de SAH. En determinadas realizaciones, dichas sustituciones de aminoácido no están en la hélice 7 del dominio III de SAH. En determinadas realizaciones, dichas sustituciones de aminoácido no están en el bucle 7 del dominio III de SAH. En determinadas realizaciones, dichas sustituciones de aminoácido no están en la hélice 8 del dominio III de SAH. En determinadas realizaciones, dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH no están en el bucle 8 del dominio III de SAH. En determinadas realizaciones, dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH no están en el bucle 9 del dominio III de SAH.
- En determinadas realizaciones, dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH no están en al menos dos bucles del dominio III de SAH seleccionados del grupo que consiste en los bucles 2, 3, 6, 7, 8 y 9. En determinadas realizaciones, dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH no están en al menos tres bucles del dominio III de SAH seleccionados del grupo que consiste en los bucles 2, 3, 6, 7, 8 y 9. En determinadas realizaciones, dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH no están en al menos cuatro bucles del dominio III de SAH seleccionados del grupo que consiste en los bucles 2, 3, 6, 7, 8 y 9. En determinadas realizaciones, dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH no están en las hélices 7 u 8.
- En determinadas realizaciones, el dominio III comprende al menos dos sustituciones de aminoácido y dichas sustituciones de aminoácidos están en al menos dos de los bucles y/o hélices del dominio III de SAH seleccionados del grupo que consiste en los bucles 2, 3, 6, 7, 8 y 9 y las hélices 7 y 8. En determinadas realizaciones, el dominio III comprende al menos tres sustituciones de aminoácido y dichas sustituciones de aminoácidos están en al menos tres de los bucles y/o hélices del dominio III de SAH seleccionados del grupo que consiste en los bucles 2, 3, 6, 7, 8 y 9 y las hélices 7 y 8. En determinadas realizaciones, el dominio III comprende al menos cuatro sustituciones de aminoácido y dichas sustituciones de aminoácidos están en al menos cuatro de los bucles y/o hélices del dominio III de SAH seleccionados del grupo que consiste en los bucles 2, 3, 6, 7, 8 y 9 y las hélices 7 y 8. En determinadas realizaciones, el dominio III comprende al menos cinco sustituciones de aminoácido y dichas sustituciones de aminoácidos están en al menos cinco de los bucles y/o hélices del dominio III de SAH seleccionados del grupo que consiste en los bucles 2, 3, 6, 7, 8 y 9 y las hélices 7 y 8. En determinadas realizaciones, el dominio III comprende al menos seis sustituciones de aminoácido y dichas sustituciones de aminoácidos están en al menos seis de los bucles y/o hélices del dominio III de SAH seleccionados del grupo que consiste en los bucles 2, 3, 6, 7, 8 y 9 y las hélices 7 y 8. En determinadas realizaciones, el dominio III comprende al menos cinco sustituciones de aminoácido y dichas sustituciones de aminoácidos están en cada uno de los bucles 2, 3, 6, 7, 8 y 9 del dominio III de SAH. En determinadas realizaciones, el dominio III comprende al menos seis sustituciones de aminoácido y dichas sustituciones de aminoácidos están en cada uno de los bucles 2, 3, 6, 7, 8 y 9 del dominio III de SAH. En determinadas realizaciones, el dominio III comprende al menos dos sustituciones de aminoácido y dichas sustituciones de aminoácidos están en cada una de las hélices 7 y 8 del dominio III de SAH.
- Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en el bucle 2 y puede seleccionarse de: resto 415, resto 416, resto 417, resto 418 y resto 419. Más de una (2, 3, 4, 5) sustitución de aminoácido puede estar en el bucle 2 y puede seleccionarse de: resto 415, resto 416, resto 417, resto 418 y resto 419. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH del bucle 2 puede seleccionarse de: V415C, V415S, V415T, Q416H y Q416P. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en el bucle 3 y puede seleccionarse de: resto 439, resto 440, resto 441, resto 442 y resto 443. Más de una (2, 3, 4, 5) sustitución de aminoácido puede estar en el bucle 3 y puede seleccionarse de: resto 439, resto 440, resto 441, resto 442 y resto 443. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH del bucle 3 puede seleccionarse de: E442K y E442R. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en el bucle 6 y puede seleccionarse de: resto 492, resto 493, resto 494, resto 495, resto 496, resto 497, resto 498, resto 499, resto 500, resto 501, resto 502, resto 503, resto 504, resto 505, resto 506, resto 507, resto 508 y resto 509. Más de una (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) sustitución de aminoácido puede estar en el bucle 6 y puede seleccionarse de: resto 492, resto 493, resto 494, resto 495, resto 496, resto 497, resto 498, resto 499, resto 500, resto 501, resto 502, resto 503, resto 504, resto 505, resto 506, resto 507, resto 508 y resto 509. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH del bucle 6 puede seleccionarse de: T506F, T506W, T506Y, T508K, T508R, T508S, F509C, F509I, F509L, F509M, F509V, F509W y F509Y. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en la hélice 7 y puede seleccionarse de: resto 510, resto 511, resto 512, resto 513, resto 514 y resto 515. Más de una (2, 3, 4, 5, 6)

5 sustitución de aminoácido puede estar en la hélice 7 y puede seleccionarse de: resto 510, resto 511, resto 512, resto 513, resto 514 y resto 515. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH del bucle 7 puede seleccionarse de: A511F, A511W, A511Y, D512F, D512W, D512Y, T515C, T515H, T515N, T515P, T515Q y T515S. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en el bucle 7 y puede seleccionarse de: resto 516, resto 517 y resto 518. Más de una (2, 3) sustitución de aminoácido puede estar en el bucle 7 y puede seleccionarse de: resto 516, resto 517 y resto 518. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH del bucle 7 puede seleccionarse de: L516F, L516S, L516T, L516W, L516Y, S517C, S517F, S517M, S517T, S517W y S517Y. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en la hélice 8 y puede seleccionarse de: resto 519, resto 518, resto 519, resto 520, resto 521, resto 522, resto 523, resto 524, resto 525, resto 526, resto 527, resto 528, resto 529, resto 530, resto 531, resto 532, resto 533, resto 534, resto 535 y resto 536. Más de una (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) sustitución de aminoácido puede estar en la hélice 8 y puede seleccionarse de: resto 519, resto 518, resto 519, resto 520, resto 521, resto 522, resto 523, resto 524, resto 525, resto 526, resto 527, resto 528, resto 529, resto 530, resto 531, resto 532, resto 533, resto 534, resto 535 y resto 536. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH de la hélice 8 y puede seleccionarse de: K519A, K519G, K519I, K519L, K519V, R521F, R521W, R521Y, I523A, I523D, I523E, I523F, I523G, I523I, I523K, I523L, I523N, I523Q, I523R, I523V, I523W, I523Y, K524A, K524G, K524I, K524L, K524V, K525A, K525G, K525I, K525L, K525V, Q526C, Q526M, Q526S, Q526T, Q526Y, T527F, T527W, T527Y, E531A, E531G, E531I, E531L, E531V, H535D, H535E y H535P. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en el bucle 8 y puede seleccionarse de: resto 537, resto 538, resto 539, resto 540 y resto 541. Más de una (2, 3, 4, 5) sustitución de aminoácido puede estar en el bucle 8 y puede seleccionarse de: resto 537, resto 538, resto 539, resto 540, resto 541. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en el bucle 9 y puede seleccionarse de: resto 561, resto 562, resto 563, resto 564. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH del bucle 8 puede seleccionarse de: K538F, K538W, K538Y, A539I, A539L, A539V, K541F, K541W, K541Y. Más de una (2, 3, 4) sustitución de aminoácido puede estar en el bucle 9 y puede seleccionarse de: resto 561, resto 562, resto 563, resto 564. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH del bucle 9 puede seleccionarse de: A561F, A561W y A561Y.

30 Se contemplan adicionalmente inserciones o eliminaciones en el dominio III que, por ejemplo, aumentan o disminuyen la longitud de un bucle del dominio III de SAH. Dicha inserción o eliminación en el dominio III de SAH puede alterar la longitud del bucle 2. Dicha inserción o eliminación en el dominio III de SAH puede alterar la longitud del bucle 3. Dicha inserción o eliminación en el dominio III de SAH puede alterar la longitud del bucle 6. Dicha inserción o eliminación en el dominio III de SAH puede alterar la longitud de la hélice 7. Dicha inserción o eliminación en el dominio III de SAH puede alterar la longitud del bucle 7. Dicha inserción o eliminación en el dominio III de SAH puede alterar la longitud de la hélice 8. Dicha inserción o eliminación en el dominio III de SAH puede alterar la longitud del bucle 8. Dicha inserción o eliminación en el dominio III de SAH puede alterar la longitud del bucle 9. Dicha inserción o eliminación en el dominio III puede alterar la longitud de al menos dos bucles y/o hélices seleccionados del grupo que consiste en los bucles 2, 3, 6, 7, 8 y 9 y las hélices 7 y 8. Dicha inserción o eliminación en el dominio III puede alterar la longitud de al menos tres bucles y/o hélices seleccionados del grupo que consiste en los bucles 2, 3, 6, 7, 8 y 9 y las hélices 7 y 8. Dicha inserción o eliminación en el dominio III puede alterar la longitud de al menos cuatro bucles y/o hélices seleccionados del grupo que consiste en los bucles 2, 3, 6, 7, 8 y 9 y las hélices 7 y 8. Dicha inserción o eliminación en el dominio III puede alterar la longitud de al menos cinco bucles y/o hélices seleccionados del grupo que consiste en los bucles 2, 3, 6, 7, 8 y 9 y las hélices 7 y 8. Dicha inserción o eliminación en el dominio III de SAH puede alterar la longitud de cada uno de los bucles 2, 3, 6, 7, 8 y 9 del dominio III de SAH. Obsérvese que cuando se alteran múltiples bucles y/o hélices, la divulgación contempla que los bucles y/o hélices se alteren independientemente, de modo que uno o más bucles/hélices pueden aumentarse por inserción y uno o más bucles/hélices pueden disminuirse por eliminación.

50 Para las realizaciones en que el dominio III incluye una inserción o eliminación de aminoácidos, la divulgación contempla inserciones o eliminaciones de un aminoácidos. También se contemplan, inserciones o eliminaciones de más de un aminoácidos, tal como, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 aminoácidos. En determinadas realizaciones, la divulgación contempla inserciones de más de 10 restos de aminoácido, tal como 10-20, 20-40, 40-50, 50-100 aminoácidos. Coherente con los polipéptidos quiméricos y los polipéptidos variantes de SAH de la divulgación, las composiciones que incluyen inserciones o eliminaciones se ensayan para confirmar que retienen la actividad de unión a FcRn. Las composiciones pueden proporcionar una mejorada de la unión a FcRn y/o semivida en suero respecto a los controles.

60 Con fines de claridad, la divulgación contempla específicamente combinaciones de cualquiera de los aspectos y realizaciones anteriores o siguientes. En el contexto de un polipéptido quimérico que comprende una parte de SAH, así como en el contexto de un polipéptido SAH variante que comprende una parte de SAH, dicha parte de SAH comprende el dominio III o una parte de unión a FcRn del mismo. Además, como se describe en este documento, el dominio III de la parte de SAH incluye de una o dieciocho sustituciones de aminoácido. El dominio III de la parte de SAH puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 sustituciones de aminoácido. Las sustituciones de aminoácido ejemplares incluyen: (i) remplazo con alanina; (ii) sustitución conservativa de aminoácido; (iii) sustitución no conservativa de aminoácido. La divulgación contempla que todas las sustituciones de aminoácido en el dominio III de un polipéptido dado pueden ser un miembro de una de estas categorías de

sustitución de aminoácidos, y también contempla que cada sustitución de aminoácido en el dominio III de un polipéptido dado puede seleccionarse individual e independientemente de estas categorías. En determinadas realizaciones, los restos de cisteína naturales del dominio III se mantienen y no se sustituyen. En determinadas realizaciones, los restos de prolina naturales del dominio III se mantienen y no se sustituyen. En determinadas realizaciones, los restos de cisteína naturales y los restos de prolina naturales del dominio III se mantienen y no se sustituyen. En determinadas realizaciones, un resto de cisteína no se sustituye (por ejemplo, una cistina no se usa para remplazar un resto natural). En determinadas realizaciones, un resto de prolina no se sustituye (por ejemplo, una prolina no se usa para remplazar un resto natural). En otras realizaciones, uno cualquiera de los veinte aminoácidos se usa para sustituir un resto natural dado.

Las variantes de SAH y polipéptidos quiméricos que comprenden cualquier combinación de las clases anteriores de sustituciones de aminoácido también se contemplan.

La presente invención proporciona variantes y polipéptidos quiméricos con una parte de SAH como se define en las reivindicaciones. Las secuencias de aminoácidos que son sustancialmente iguales que las secuencias descritas en este documento incluyen secuencias que comprenden sustituciones conservativas de aminoácido, así como eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos. Una sustitución conservativa de aminoácidos se refiere al remplazo de un primer aminoácidos por un segundo aminoácido que tiene propiedades químicas y/o físicas (por ejemplo, carga, estructura, la polaridad, hidrofobicidad/hidrofiliidad) que son similares a las del primer aminoácidos. Las sustituciones conservativas de aminoácido incluyen el remplazo de un aminoácido por otro dentro de los siguientes grupos: lisina (K), arginina (R) e histidina (H); aspartato (D) y glutamato (E); asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), tirosina (Y), K, R, H, D y E; alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), fenilalanina (F), triptófano (W), metionina (M), cisteína (C) y glicina (G); F, W e Y; C, S y T.

Dicho polipéptido variante de SAH puede estar sustancialmente purificado. Dicho polipéptido quimérico puede estar sustancialmente purificado. La invención proporciona una composición que comprende la variante de SAH o el polipéptido quimérico de la divulgación, y un vehículo farmacéuticamente aceptable como se define en las reivindicaciones. La composición puede ser una composición estéril. La composición puede ser apirógena.

4.4 Mutantes de combinación del dominio III

Esta invención contempla además la generación de conjuntos de mutantes de combinación de una parte de SAH que comprende el dominio III, así como mutantes de truncamiento, y es especialmente útil para identificar secuencias variantes bioactivas. Pueden generarse variantes derivadas de forma combinatoria que tienen una potencia selectiva respecto a un polipéptido SAH de origen natural. Asimismo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen semividas intracelulares drásticamente diferentes a las del polipéptido SAH de tipo silvestre correspondiente. Por ejemplo, la proteína alterada puede volverse más estable o menos estable a degradación proteolítica u otro proceso celular que provocará destrucción de, o la inactivación de otro modo de la proteína de interés. Dichas variantes pueden utilizarse para alterar el nivel de polipéptido SAH modulando su semivida. Hay muchas maneras por las que puede generarse la colección de variantes de SAH potenciales, por ejemplo, a partir de una secuencia oligonucleotídica degenerada. La síntesis química de una secuencia génica degenerada puede realizarse en un sintetizador automatizado de ADN, y los genes sintéticos entonces se ligan en un gen apropiado para su expresión. El propósito de un conjunto degenerado de genes es proporcionar, en una mezcla, todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de secuencias polipeptídicas potenciales. La síntesis de los oligonucleótidos degenerados es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Narang, SA (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura *et al.*, (1981) Recombinant DNA, Proc. 3.^{er} Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pág. 273-289; Itakura *et al.*, (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura *et al.*, (1984) Science 198:1056; Ike *et al.*, (1983) Nucleic Acid Res. 11:477). Dichas técnicas se han empleado en la evolución dirigida de otras proteínas (véase, por ejemplo, Scott *et al.*, (1990) Science 249:386-390; Roberts *et al.*, (1992) PNAS USA 89:2429-2433; Devlin *et al.*, (1990) Science 249: 404-406; Cwirla *et al.*, (1990) PNAS USA 87: 6378-6382; así como las patentes de Estados Unidos n.º: 5223409, 5198346 y 5096815).

Como alternativa, pueden utilizarse otras formas de mutagénesis para generar una colección combinatoria. Por ejemplo, las variantes del polipéptido SAH pueden generarse y aislarse de una colección por cribado usando, por ejemplo, mutagénesis por barrido de alanina y similares (Ruf *et al.*, (1994) Biochemistry 33:1565-1572; Wang *et al.*, (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balint *et al.*, (1993) Gene 137:109-118; Grodberg *et al.*, (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashima *et al.*, (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowman *et al.*, (1991) Biochemistry 30:10832-10838; y Cunningham *et al.*, (1989) Science 244:1081-1085), por mutagénesis de barrido con conector (Gustin *et al.*, (1993) Virology 193:653-660; Brown *et al.*, (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnight *et al.*, (1982) Science 232:316); por mutagénesis por saturación (Meyers *et al.*, (1986) Science 232:613); por mutagénesis por PCR (Leung *et al.*, (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19); o por mutagénesis aleatoria, incluyendo mutagénesis química, etc. (Miller *et al.*, (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; y Greener *et al.*, (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34). La mutagénesis por barrido con conector, particularmente en un entorno de combinación, es un método atractivo para identificar formas truncadas (bioactivas) del polipéptido SAH. En este documento se proporcionan métodos adicionales para generar y cribar colecciones de variantes del polipéptido SAH, véase, por ejemplo, la sección 6 titulada "Ejemplificaciones". En particular, las secciones 6.10 y

6.11 para métodos específicos útiles para la generación y cribado de una colección combinatoria de mutante del dominio III de SAH.

5 Cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente para sustituciones de aminoácido en los polipéptidos de la divulgación puede usarse para crear colecciones de péptidos. En determinadas realizaciones, se generan variantes de forma combinatoria en restos en el dominio III de SAH. En determinadas realizaciones, las mutaciones del dominio III se introducen y criban en el contexto de uno o más de los siguientes: (i) construcciones del dominio III variante en solitario; (ii) construcciones del dominio III variante presentadas en el contexto de SAH de longitud completa; o (iii) en el contexto de SAH truncada o un polipéptido quimérico que comprende al menos el dominio III.

10 En determinadas realizaciones, las colecciones de péptidos se criban para las variantes que tienen una o ambas de afinidad aumentada por FcRn y semivida en suero aumentada respecto al polipéptido de partida. En determinadas realizaciones, las variantes se evalúan usando ensayos *in vitro* convencionales descritos en la solicitud (por ejemplo, citometría de flujo). En determinadas realizaciones, se identifican una o más variantes que presentan afinidad mejorada por FcRn. En otras realizaciones, las variantes se criban para determinar si la afinidad mejorada por FcRn se produce únicamente a pH ácido (por ejemplo, pH de aprox. 5,5), pero no a pH neutro (por ejemplo, pH de aprox. 7,4).

20 En este documento se divulgan variantes derivadas de forma combinatoria que comprenden al menos dos sustituciones de aminoácido en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 407, resto 415, resto 463, resto 495, resto 508, resto 509, resto 511, resto 512, resto 515, resto 516, resto 517, resto 521, resto 523, resto 524, resto 526, resto 527 y resto 557.

25 En este documento se divulgan variantes derivadas de forma combinatoria que comprenden al menos dos sustituciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en: L407N, L407Y, V415T, L463N, L463F, E495D, T508R, T508S, F509M, F509W, F509I, A511F, D512Y, D512M, T515Q, L516T, L516W, S517W, R521W, I523D, I523E, I523F, I523G, I523K, I523R, K524L, Q526A, Q526M, Q526Y, T527Y y T557G.

30 En este documento se divulgan variantes derivadas de forma combinatoria que comprenden sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH en las posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa, seleccionadas del grupo que consiste en: (a) restos 383 y 413; (b) restos 401 y 523; (c) restos 407 y 447; (d) restos 407 y 447 y 539; (e) restos 407 y 509; (f) restos 407 y 526; (g) restos 411 y 535; (h) restos 414 y 456; (i) restos 415 y 569; (j) restos 426 y 526; (k) restos 442 y 450 y 459; (l) restos 463 y 508; (m) restos 508 y 519 y 525; (n) restos 509 y 527; (o) restos 523 y 538; (p) restos 526 y 557; y (q) restos 541 y 561.

35 En determinadas realizaciones, las variantes derivadas de forma combinatoria se generan en restos que están conservados entre múltiples especies. En determinadas realizaciones, las variantes derivadas de forma combinatoria se generan en restos accesibles en la superficie. En determinadas realizaciones, las variantes derivadas de forma combinatoria se generan en restos que están tanto accesibles en la superficie como conservados entre múltiples especies. En determinadas realizaciones, las variantes derivadas de forma combinatoria se generan en restos que están conservados entre múltiples especies, pero no están conservados en SAH de pollo.

45 En este documento se divulga una colección que comprende una pluralidad de polipéptidos, en la que cada uno de dicha pluralidad de polipéptidos comprende el dominio III de SAH, o un fragmento de unión a FcRn del mismo, y en la que cada uno de dicha pluralidad de polipéptidos comprende independientemente al menos una sustitución de aminoácido de un resto en dicho dominio III de SAH que está conservado entre proteínas seroalbúmina de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo.

50 En este documento se divulga una colección que comprende una pluralidad de polipéptidos, en la que cada uno de dicha pluralidad de polipéptidos comprende el dominio III de SAH, o un fragmento de unión a FcRn del mismo, y en la que cada uno de dicha pluralidad de polipéptidos comprende independientemente al menos una sustitución de aminoácido de un resto en dicho dominio III de SAH que está conservado entre proteínas seroalbúmina de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo y que no está conservado en seroalbúmina de pollo.

55 En este documento se divulga una colección que comprende una pluralidad de polipéptidos, en la que cada uno de dicha pluralidad de polipéptidos comprende el dominio III de SAH, o un fragmento de unión a FcRn del mismo, y en la que cada uno de dicha pluralidad de polipéptidos comprende independientemente al menos una sustitución de aminoácido de un resto en dicho dominio III de SAH que es un resto accesible en la superficie.

60 En este documento se divulga una colección que comprende una pluralidad de polipéptidos, en la que cada uno de dicha pluralidad de polipéptidos comprende el dominio III de SAH, o un fragmento de unión a FcRn del mismo, y en la que cada uno de dicha pluralidad de polipéptidos comprende independientemente al menos una sustitución de aminoácido de un resto en dicho dominio III de SAH que es (i) un resto accesible en la superficie y también (ii) está conservado entre proteínas seroalbúmina de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo.

65

Dicho resto accesible en la superficie puede estar en el bucle 2 del dominio III de SAH. Dicho resto accesible en la superficie puede estar en el bucle 3 del dominio III de SAH. Dicho resto accesible en la superficie puede estar en el bucle 6 del dominio III de SAH. Dicho resto accesible en la superficie puede estar en la hélice 7 del dominio III de SAH. Dicho resto accesible en la superficie puede estar en el bucle 7 del dominio III de SAH. Dicho resto accesible en la superficie puede estar en la hélice 8 del dominio III de SAH. Dicho resto accesible en la superficie puede estar en el bucle 8 del dominio III de SAH. Dicho resto accesible en la superficie puede estar en el bucle 9 del dominio III de SAH.

En este documento se divulga al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 383, resto 389, resto 391, resto 410, resto 417, resto 425, resto 442, resto 465, resto 467, resto 468, resto 486, resto 499, resto 502, resto 520, resto 532, resto 536, resto 543 y resto 571. En este documento se divulga al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 417, resto 442, resto 499 y resto 502.

En este documento se divulga al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 392, resto 399, resto 403, resto 411, resto 412, resto 414, resto 416, resto 418, resto 420, resto 423, resto 434, resto 437, resto 438, resto 445, resto 448, resto 450, resto 453, resto 461, resto 476, resto 477, resto 484, resto 485, resto 487, resto 488, resto 494, resto 497, resto 507, resto 509, resto 514, resto 529, resto 534, resto 537, resto 540, resto 551, resto 558, resto 559, resto 567, resto 568, resto 572. En este documento se divulga al menos una de las sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en el dominio III de SAH madura de longitud completa: resto 380, resto 381, resto 384, resto 387, resto 396, resto 401, resto 404, resto 405, resto 406, resto 409, resto 419, resto 421, resto 422, resto 424, resto 428, resto 430, resto 431, resto 433, resto 441, resto 457, resto 458, resto 463, resto 464, resto 466, resto 469, resto 470, resto 474, resto 475, resto 480, resto 481, resto 489, resto 491, resto 495, resto 500, resto 508, resto 510, resto 515, resto 516, resto 524, resto 525, resto 526, resto 528, resto 531, resto 535, resto 539, resto 544, resto 547, resto 576.

Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en el bucle 2 del dominio III de SAH. Todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH pueden estar en el bucle 2 del dominio III de SAH. El dominio III de SAH puede comprender al menos una de dichas sustituciones de aminoácido del dominio III de SAH en el bucle 2 del dominio III de SAH, y puede incluir además una o más sustituciones de aminoácido adicionales en el dominio III de SAH que no están en el bucle 2. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en el bucle 3 del dominio III de SAH. Todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH pueden estar en el bucle 3 del dominio III de SAH. El dominio III de SAH puede comprender al menos una sustitución de aminoácido en el bucle 3 del dominio III de SAH, y puede incluir además una o más sustituciones de aminoácido adicionales en el dominio III de SAH que no están en el bucle 3. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en el bucle 6 del dominio III de SAH. Todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH pueden estar en el bucle 6 del dominio III de SAH. El dominio de SAH puede comprender al menos una sustitución de aminoácido en el bucle 6 del dominio III de SAH, y puede incluir además una o más sustituciones de aminoácido adicionales en el dominio III de SAH que no están en el bucle 6. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en la hélice 7 del dominio III de SAH. Todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH pueden estar en la hélice 7 del dominio III de SAH. El dominio de SAH puede comprender al menos una sustitución de aminoácido en la hélice 7 del dominio III de SAH, y puede incluir además una o más sustituciones de aminoácido adicionales en el dominio III de SAH que no están en la hélice 7. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en el bucle 7 del dominio III de SAH. Todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH pueden estar en el bucle 7 del dominio III de SAH. El dominio de SAH puede comprender al menos una sustitución de aminoácido en el bucle 7 del dominio III de SAH, y puede incluir además una o más sustituciones de aminoácido adicionales en el dominio III de SAH que no están en el bucle 7. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en la hélice 8 del dominio III de SAH. Todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH pueden estar en la hélice 8 del dominio III de SAH. El dominio de SAH puede comprender al menos una sustitución de aminoácido en la hélice 8 del dominio III de SAH, y puede incluir además una o más sustituciones de aminoácido adicionales en el dominio III de SAH que no están en la hélice 8. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en el bucle 8 del dominio III de SAH. Todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH pueden estar en el bucle 8 del dominio III de SAH. El dominio III de SAH puede comprender al menos una sustitución de aminoácido en el bucle 8 del dominio III de SAH, y puede incluir además una o más sustituciones de aminoácido adicionales en el dominio III de SAH que no están en el bucle 8. Al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH puede estar en el bucle 9 del dominio III de SAH. Todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH pueden estar en el bucle 9 del dominio III de SAH. El dominio III de SAH puede comprender al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH, y puede incluir además una o más sustituciones de aminoácido adicionales en el dominio III de SAH que no están en el bucle 9.

En determinadas realizaciones de cualquiera de los aspectos o realizaciones anteriores o siguientes, una sustitución de aminoácido puede ser una alteración de un resto a una alanina. En determinadas realizaciones de cualquiera de

los aspectos o realizaciones anteriores o siguientes, una sustitución de aminoácido puede ser una sustitución conservativa de aminoácido en la que un resto se reemplaza con un resto con carga y otras propiedades similares. En determinadas realizaciones de cualquiera de los aspectos o realizaciones anteriores o siguientes, una sustitución de aminoácido puede ser una sustitución no conservativa de aminoácido en la que un resto se reemplaza con un resto que no tiene carga u otras propiedades similares. En determinadas realizaciones de cualquiera de los aspectos o realizaciones anteriores o siguientes, una sustitución de aminoácido puede ser una alteración de un resto por cualquier otro resto. Cuando una parte de SAH comprende más de un resto de aminoácido, se contempla que las sustituciones pueden estar en una cualquiera o cualquier combinación de las categorías anteriores de sustituciones de aminoácido. Por ejemplo, todas las sustituciones pueden ser cambios a alanina o pueden ser sustituciones conservativas de aminoácido o pueden ser sustituciones no conservativas de aminoácido. Como alternativa, las sustituciones de aminoácido pueden incluir cualquier combinación, tal como, por ejemplo, un cambio a una alanina, una sustitución conservativa de aminoácido y una sustitución no conservativa de aminoácido.

En la técnica se conoce una amplia gama de técnicas para cribar productos génicos de colecciones combinatorias hechas por mutaciones puntuales y truncamientos y, por esa cuestión, para cribar colecciones de ADNc para productos génicos que tenga una determinada propiedad. Dichas técnicas generalmente serán adaptables para el cribado rápido de las genotecas generadas por la mutagénesis combinatoria de los polipéptidos SAH. Las técnicas más ampliamente usadas para cribar grandes genotecas normalmente comprenden clonar la genoteca en vectores de expresión replicables, transformar las células apropiadas con la colección resultante de vectores y expresar los genes de combinación en condiciones en que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento relativamente fácil del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. Cada uno de los ensayos ilustrativos descritos a continuación son susceptibles a análisis de alto rendimiento según lo necesario para cribar grandes cantidades de secuencias degeneradas creadas por técnicas de mutagénesis combinatoria.

En determinadas realizaciones, un polipéptido SAH de la invención puede incluir un péptido y un péptidomimético. Como se usa en este documento, el término "peptidomimético" incluye péptidos modificados químicamente y moléculas de tipo péptido que contienen aminoácidos que no son de origen natural, peptoides y similares. Los peptidomiméticos proporcionan diversas ventajas sobre un péptido, incluyendo estabilidad potenciada cuando se administran a un sujeto. Los métodos para identificar un peptidomimético son bien conocidos en la técnica e incluyen el cribado de bases de datos que contienen colecciones de peptidomiméticos potenciales. Por ejemplo, la Cambridge Structural Database contiene una colección de más de 300 000 compuestos que tienen estructuras cristalinas conocidas (Allen *et al.*, Acta Crystallogr. Sección B, 35:2331 (1979)). Cuando no está disponible la estructura cristalina de una molécula diana, puede generarse una estructura usando, por ejemplo, el programa CONCORD (Rusinko *et al.*, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 29:251 (1989)). Otra base de datos, el Available Chemicals Directory (Molecular Design Limited, Informations Systems; San Leandro Calif.), contiene aproximadamente 100 000 compuestos que están disponibles en el mercado y también puede hacerse una búsqueda para identificar peptidomiméticos potenciales de los polipéptidos SAH.

En determinadas realizaciones, un polipéptido SAH de la invención puede comprender además modificaciones postraduccionales. La modificación postraduccional de la proteína ejemplar incluye fosforilación, acetilación, metilación, ADP-ribosilación, ubiquitinación, glucosilación, carbonilación, sumoilación, biotilación o adición de una cadena lateral polipeptídica o de un grupo hidrófobo. Como resultado, los polipéptidos SAH modificados pueden contener elementos que no son aminoácido, tales como lípidos, poli- o monosacárido y fosfatos. Los efectos de dichos elementos que no son aminoácido en la funcionalidad de un polipéptido SAH pueden ensayarse para su actividad biológica, por ejemplo, su capacidad de unirse a FcRn. Dado que el polipéptido SAH natural puede glucosilarse, en determinadas realizaciones un polipéptido SAH usado en un polipéptido quimérico de acuerdo con la presente divulgación está glucosilado. En determinadas realizaciones, el nivel y patrón de glucosilación es igual o sustancialmente igual al del polipéptido SAH natural. En otras realizaciones, el nivel y/o patrón de glucosilación difiere del polipéptido SAH natural (por ejemplo, subglucosilado, sobreglucosilado, no glucosilado).

En determinadas realizaciones de la presente invención, un polipéptido que comprende una parte de SAH (por ejemplo, variante de SAH o polipéptido quimérico) como se define en las reivindicaciones puede conjugarse con un agente no proteínico. Dichos agente no proteínicos incluyen, aunque sin limitación, moléculas de ácido nucleico, agentes químicos, moléculas orgánicas, etc., cada uno de los cuales puede obtenerse de fuentes naturales, tales como, por ejemplo, cribado de productos naturales o puede sintetizarse químicamente. En determinadas realizaciones, la parte de SAH se conjuga químicamente con el agente no proteínico.

En una realización específica de la presente invención, un polipéptido SAH puede modificarse con polímeros no proteínicos. En una realización específica, el polímero es polietilenglicol ("PEG"), polipropilenglicol, o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las patentes de Estados Unidos n.º 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 o 4179337. El PEG es un polímero hidrosoluble bien conocido que está disponible en el mercado o puede prepararse por polimerización de abertura de anillo de etilenglicol de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica (Sandler y Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, Nueva York, Vol. 3, páginas 138-161).

En determinadas realizaciones, los fragmentos o variantes del polipéptido SAH preferiblemente retendrán al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de la actividad biológica asociada con el polipéptido SAH

- natural. En determinadas realizaciones, los fragmentos o variantes del polipéptido SAH tienen una semivida ($t_{1/2}$) que está potenciada respecto a la semivida de la proteína natural. Para realizaciones en que la semivida está potenciada, la semivida de los fragmentos o variantes de SAH está potenciada en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 %, 250 %, 300 %, 400 % o 500 % o incluso en un 1000 % respecto a la semivida de la proteína SAH natural. En algunas realizaciones, la semivida de la proteína se determina *in vitro*, tal como en una solución salina tamponada o en suero. En otras realizaciones, la semivida de la proteína es una semivida *in vivo*, tal como la semivida de la proteína en el suero u otro líquido corporal de un animal.
- En determinados aspectos, un polipéptido que comprende una parte de SAH puede ser una proteína de fusión que comprende además uno o más dominios de fusión. Los ejemplos bien conocidos de dichos dominios de fusión incluyen, aunque sin limitación, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G y una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), proteína de unión a maltosa (MBP), que son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión por cromatografía de afinidad. Con fines de purificación por afinidad, se usan matrices pertinentes para cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Los dominios de fusión también incluyen "marcas epitópicas", que habitualmente son secuencias peptídica cortas para las que hay un anticuerpo específico disponible. Las marcas epitópicas bien conocidas para las que hay anticuerpos monoclonales específicos fácilmente disponibles incluyen FLAG, hemaglutinina del virus de la gripe (HA) y en marcas c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión por proteasa, tal como para factor Xa o trombina, que permite que la proteasa pertinente digiera parcialmente las proteínas de fusión y libere de ese modo las proteínas recombinantes de los mismos. Las proteínas liberadas entonces pueden aislarse del dominio de fusión por separación cromatográfica posterior. En determinadas realizaciones, los polipéptidos SAH pueden contener una o más modificaciones que pueden estabilizar los polipéptidos. Por ejemplo, dichas modificaciones potencian la semivida *in vitro* de los polipéptidos, potencian la semivida en circulación de los polipéptidos o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos. Asimismo, en el contexto de polipéptidos quiméricos, los tipos anteriores de modificaciones pueden adjuntarse de forma adicional o alternativa a la parte de proteína heteróloga del polipéptido quimérico.
- En algunas realizaciones, un polipéptido que comprende una parte de SAH puede ser una proteína de fusión con la totalidad o una parte de una región Fc de una inmunoglobulina. En determinadas realizaciones, la proteína de fusión comprende el dominio de unión a FcRn de IgG o un fragmento del mismo. Asimismo, en determinada realización, la totalidad o una parte de una región Fc de una inmunoglobulina puede usarse como conector para unir parte de SAH a una proteína heteróloga. Como se sabe, cada región constante de cadena pesada de inmunoglobulina comprende cuatro o cinco dominios. Los dominios se nombran secuencialmente de la siguiente manera: CH1-bisagra-CH2-CH3(-CH4). Las secuencias de ADN de los dominios de cadena pesada tienen homología cruzada entre las clases de inmunoglobulina, por ejemplo, el dominio CH2 de IgG es homólogo al dominio CH2 de IgA o IgD, y al dominio CH3 de IgM e IgE. Como se usa en este documento, se entiende que la expresión "región Fc de inmunoglobulina" significa la parte del extremo carboxilo de una región constante de cadena de inmunoglobulina, preferiblemente una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina o una parte de la misma. Por ejemplo, una región Fc de inmunoglobulina puede comprender 1) un dominio CH1, un dominio CH2 y un dominio CH3, 2) un dominio CH1 y un dominio CH2, 3) un dominio CH1 y un dominio CH3, 4) un dominio CH2 y un dominio CH3 o 5) una combinación de dos o más dominios y una región de bisagra de inmunoglobulina. En una realización preferida, la región Fc de inmunoglobulina comprende al menos una región de bisagra de inmunoglobulina, un dominio CH2 y un dominio CH3, y preferiblemente carece del dominio CH1. En una realización, la clase de inmunoglobulina de la que se obtiene la región constante de cadena pesada es IgG (Igy) (subclases γ 1, 2, 3 o 4). Pueden usarse otras clases de inmunoglobulina, IgA (Iga), IgD (Igd), IgE (Ige) e IgM (Igm). La elección de las regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina apropiadas se analiza en detalle en las patentes de Estados Unidos n.º 5541087 y 5726044. La elección de las secuencias de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina particulares para determinadas clases y subclases de inmunoglobulina para conseguir un resultado particular se considera dentro del nivel de habilidad en la técnica. La parte de la construcción de ADN que codifica la región Fc de inmunoglobulina comprende preferiblemente al menos una parte de un dominio de bisagra y preferiblemente al menos una parte de un dominio CH₃ de Fc γ o los dominios homólogos en cualquiera de IgA, IgD, IgE o IgM. Además, se contempla que la sustitución o eliminación de aminoácidos dentro de las regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina puede ser útil en la práctica de la invención. Un ejemplo sería introducir sustituciones de aminoácido en la región CH2 superior para crear una variante Fc con afinidad reducida por receptores Fc (Cole *et al.* (1997) J. IMMUNOL. 159:3613). Un experto en la materia puede preparar dichas construcciones usando técnicas de biología molecular bien conocidas. Asimismo, en el contexto de polipéptidos quiméricos, los tipos anteriores de modificaciones pueden adjuntarse de forma adicional o alternativa a la parte de proteína heteróloga del polipéptido quimérico.
- En determinados aspectos, un polipéptido SAH puede ser un esqueleto. En determinadas realizaciones, se usa una proteína para seleccionar o diseñar una estructura proteínica que puede unirse específicamente a una diana. Cuando se diseñan proteínas a partir del esqueleto, los restos de aminoácido que son importantes para las propiedades favorables de la estructura se retienen, mientras que otros restos pueden variarse. En determinadas realizaciones, un esqueleto puede tener menos de o igual a un 50 % de los restos de aminoácido que varían entre derivados de proteína que tienen diferentes propiedades y más de o igual a un 50 % de los restos que son constantes entre dichos derivados. En determinadas realizaciones, un esqueleto puede tener menos de o igual a un

45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de los restos de aminoácido que varían entre derivados de proteína que tienen diferentes propiedades y más de o igual a un 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de los restos que son constantes entre dichos derivados. En determinadas realizaciones, un esqueleto puede tener más de o igual a un 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de los restos de aminoácido que varían entre derivados de proteína que tienen diferentes propiedades y menos de o igual a un 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de los restos que son constantes entre dichos derivados. En determinadas realizaciones, estos restos constantes confieren el mismo plegamiento tridimensional global a todos los dominios variantes, independientemente de sus propiedades. En determinadas realizaciones, el esqueleto de polipéptido de SAH puede modificarse o sustituirse como se analiza en otros aspectos y realizaciones de la divulgación. En determinadas realizaciones, el esqueleto de polipéptido SAH puede ser un agente terapéutico. En determinadas realizaciones, el esqueleto de polipéptido SAH puede ser agonista a la diana. En determinadas realizaciones, el esqueleto de polipéptido SAH puede ser antagonista a la diana.

4.5 Polipéptidos quiméricos

Los polipéptidos que comprenden una parte de SAH, incluyendo polipéptidos variantes de SAH, de la divulgación pueden conjugarse a cualquier proteína heteróloga. En determinadas realizaciones, la proteína heteróloga es un agente terapéutico. En determinadas realizaciones, el agente terapéutico es un anticuerpo o péptido. En determinadas realizaciones, la parte de proteína heteróloga del polipéptido quimérico comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En determinadas realizaciones, el polipéptido quimérico comprende además una región constante de una inmunoglobulina IgG. En determinadas realizaciones, la proteína heteróloga comprende una proteína terapéutica que no es anticuerpo. En determinadas realizaciones, la parte de proteína heteróloga de un polipéptido quimérico comprende un factor de crecimiento o una citocina. En determinadas realizaciones, el polipéptido quimérico comprende además un epítipo. Por ejemplo, un epítipo útil para detección y/o purificación (por ejemplo, marca His, etiqueta FLAG, etc.).

En determinadas realizaciones, la parte de SAH se conjuga químicamente a la proteína heteróloga. En determinadas realizaciones, la parte de SAH se conjuga de forma recombinante a la proteína heteróloga. En determinadas realizaciones, el polipéptido quimérico se produce usando un vector recombinante que codifica tanto la parte de SAH como la proteína heteróloga.

En determinadas realizaciones, la variante de SAH se produce en una célula procariota o eucariota. En determinadas realizaciones, el polipéptido quimérico se produce en una célula procariota o eucariota. En determinadas realizaciones, la célula eucariota se selecciona de una célula de levadura, una célula de ave, una célula de insecto o una célula de mamífero.

Los polipéptidos quiméricos de la presente invención pueden generarse de diversas maneras. En determinadas realizaciones, el extremo C de una parte de SAH puede unirse al extremo N de una proteína heteróloga (por ejemplo, un anticuerpo o un péptido terapéutico). Como alternativa, el extremo C de una proteína heteróloga (por ejemplo, un anticuerpo o un péptido terapéutico) puede unirse al extremo N de una parte de SAH. En determinadas realizaciones, la parte de SAH se conjuga a un aminoácido interno de la proteína heteróloga. En determinadas realizaciones, las configuraciones potenciales incluyen el uso de parte truncadas de una secuencia de cadena pesada y ligera de anticuerpo según lo necesario para mantener la integridad funcional de la parte de SAH unida y/o la proteína heteróloga unida. En otras determinadas realizaciones, la parte de SAH comprende el dominio III de SAH, o un fragmento de unión al receptor Fc neonatal (FcRn) del mismo, y al menos una parte del dominio I de SAH o el dominio II de SAH o los dominios I y II de SAH. Además, la proteína heteróloga puede unirse a un resto interno (que no es del extremo) expuesto de la parte de SAH o una variante de la misma. En realizaciones adicionales, puede emplearse cualquier combinación de las configuraciones de SAH-proteína heteróloga, produciendo de ese modo una relación de SAH:proteína heteróloga que es mayor de 1:1 (por ejemplo, dos moléculas de SAH a una proteína heteróloga).

La parte de SAH y la proteína heteróloga pueden conjugarse directamente entre sí. Como alternativa, pueden unirse entre sí mediante una secuencia conectora, que separa la parte de SAH y la proteína heteróloga en una distancia suficiente para asegurar que cada dominio se pliega apropiadamente en sus estructuras secundarias y terciarias. En determinadas realizaciones, el conector es un conector escindible. Los conectores preferidos (1) deben adoptar una conformación extendida flexible, (2) no deben mostrar propensión a desarrollar una estructura secundaria ordenada que pudiera interactuar con los dominios funcionales del polipéptido SAH o la proteína heteróloga, y (3) deben tener carácter hidrófobo o cargado mínimo, que podría promover la interacción con los dominios de proteína funcional.

En determinadas realizaciones, la longitud del conector es de al menos 80 angstroms (Å) o al menos 100 Å, o al menos 120 Å, o al menos 140 Å, o al menos 160 Å, o al menos 180 Å, o al menos 200 Å. En determinadas realizaciones, la longitud del conector es entre aproximadamente 80 Å y aproximadamente 200 Å, o entre aproximadamente 100 Å y aproximadamente 180 Å, o entre aproximadamente 120 Å y aproximadamente 160 Å.

En determinadas realizaciones, el conector es un conector peptídico. En determinadas realizaciones, el conector es un conector peptídico y el conector peptídico tiene una o más de las siguientes características: a) permite la rotación

de la secuencia de proteína heteróloga y la parte de SAH una respecto a la otra; b) es resistente a digestión por proteasas; y c) no interactúa con la secuencia de proteína heteróloga o la parte de SAH. Los aminoácidos de superficie típicos en las regiones de proteína flexibles incluyen Gly, Asn y Ser. Se esperaría que permutaciones de secuencias de aminoácidos que contienen Gly, Asn y Ser satisfagan los criterios anteriores para una secuencia conectora. Otros aminoácidos casi neutros, tales como Thr y Ala, también pueden usarse en la secuencia conectora. En determinadas realizaciones, cada uno de los aminoácidos en el conector peptídico se selecciona del grupo que consiste en Gly, Ser, Asn, Thr y Ala. En determinadas realizaciones, el conector peptídico incluye un elemento Gly-Ser. En realizaciones específicas, el conector peptídico comprende una o más repeticiones Gly-Gly-Gly-Gly-Ser. En realizaciones específicas, el conector incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 repeticiones Gly-Gly-Gly-Gly-Ser. En una realización específica, puede usarse una longitud de secuencia conectora de aproximadamente 20 aminoácidos para proporcionar una separación adecuada de dominios de proteína funcional, aunque pueden usarse secuencias conectoras más largas o más cortas. La longitud de la secuencia conectora que separa el polipéptido de SAH y la proteína heteróloga puede ser de 5 a 500 aminoácidos de longitud, o más preferiblemente de 5 a 100 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia conectora es de aproximadamente 5-60 o de aproximadamente 5-30 aminoácidos de longitud. En determinadas realizaciones, la secuencia conectora es de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos, y ventajosamente es de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 aminoácidos. En otras realizaciones, el conector que une la parte de SAH a una proteína heteróloga puede ser un dominio constante de un anticuerpo (por ejemplo, la totalidad o una parte de una región Fc de un anticuerpo). En determinadas realizaciones, el conector es un conector escindible.

En determinadas realizaciones, los polipéptidos quiméricos de la presente invención pueden generarse usando reactivos y protocolos de entrecruzamiento bien conocidos. Por ejemplo, hay una gran cantidad de agentes de entrecruzamiento químicos que son conocidos para los expertos en la materia y útiles para entrecruzar el polipéptido SAH con una proteína heteróloga (por ejemplo, un anticuerpo). Por ejemplo, los agentes de entrecruzamiento son agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales, que pueden usarse para unir moléculas de una manera por etapas. Los agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales proporcionan la capacidad de diseñar métodos de acoplamiento más específicos para conjugar proteínas, reduciendo de ese modo la aparición de reacciones secundarias indeseadas tales como polímeros de homoproteína. Se conoce una amplia diversidad de agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales en la técnica, incluyendo 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), éster de m-maleimidobenzil-N-hidroxisuccinimida (MBS); (4-yodoacetil) aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB), 4-(p-maleimidofenil) butirato de succinimidilo (SMPB), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC); 4-succinimidiloxicarbonil-a-metil-a-(2-piridilditio)-tolueno (SMPT), 3-(2-piridilditio) propionato de N-succinimidilo (SPDP), 6-[3-(2-piridilditio) propionato] hexanoato de succinimidilo (LC-SPDP). Aquellos agentes de entrecruzamiento que tienen restos N-hidroxisuccinimida pueden obtenerse como los análogos de N-hidroxisulfosuccinimida, que generalmente tienen mayor solubilidad en agua. Además, aquellos agentes de entrecruzamiento que tienen puentes disulfuro dentro de la cadena de unión pueden sintetizarse en su lugar como los derivados alquilo para reducir la cantidad de escisión del conector *in vivo*. Además de los agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales, existen otros varios agentes de entrecruzamiento que incluyen agentes de entrecruzamiento homobifuncionales y fotorreactivos. El suberato de disuccinimidilo (DSS), el bismaleimidohexano (BMH) y el dimetilpimelidato.2 HCl (DMP) son ejemplos de agentes de entrecruzamiento homobifuncionales útiles y el bis-[B-(4-acidosalicilamido)etil]disulfuro (BASED) y N-succinimidil-6(4'-acido-2'-nitrofenilamino)hexanoato (SANPAH) son ejemplos de agentes de entrecruzamiento fotorreactivos útiles para su uso en esta invención. Para una revisión reciente de las técnicas de acoplamiento de proteínas, véase Means *et al.* (1990) *Bioconjugate Chemistry*. 1:2-12.

Una clase particularmente útil de agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales, incluidos los anteriores, contiene el grupo reactivo amina primaria, N-hidroxisuccinimida (NHS), o su análogo hidrosoluble N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS). Las aminas primarias (grupos lisina épsilon) a pH alcalino están sin protonar y reaccionan por ataque nucleófilo en NHS o ésteres de sulfo-NHS. Esta reacción provoca la formación de un enlace amida, y libera NHS o sulfo-NHS como subproducto. Otro grupo reactivo útil como parte de un agente de entrecruzamiento heterobifuncional es un grupo reactivo tiol. Los grupos reactivo tiol habituales incluyen maleimidias, halógenos y piridil disulfuros. Las maleimidias reaccionan específicamente con sulfhidrilos libres (restos de cisteína) en minutos, en condiciones ligeramente ácidas a neutras (pH 6,5-7,5). Los halógenos (funciones yodoacetilo) reaccionan con grupos --SH a pH fisiológico. Estos dos grupos reactivos provocan la formación de enlaces tioéter estables. El tercer componente del agente de entrecruzamiento heterobifuncional es el brazo espaciador o puente. El puente es la estructura que conecta los dos extremos reactivos. El atributo más evidente del puente es su efecto sobre la impedancia estérica. En algunos casos, un puente más largo puede abarcar más fácilmente la distancia necesaria para unir dos biomoléculas complejas.

La preparación de conjugados de proteína usando reactivos heterobifuncionales es un proceso de dos etapas que implica la reacción de amina y la reacción de sulfhidrilo. Para la primera etapa, la reacción de amina, la proteína elegida debe contener una amina primaria. Esta puede ser épsilon amina de lisina o una alfa amina primaria encontrada en el extremo N de la mayoría de las proteínas. La proteína no debe contener grupos sulfhidrilo libres. En casos donde ambas proteínas a conjugar contienen grupos sulfhidrilo libres, una proteína puede modificarse de modo que todos los sulfhidrilos se bloqueen usando, por ejemplo, N-etilmaleimida (véase, Partis *et al.* (1983) *J. Pro. Chem.* 2:263).

Puede usarse reactivo de Ellman para calcular la cantidad de sulfhidrilos en una proteína particular (véase, por ejemplo, Ellman *et al.* (1958) Arch. Biochem. Biophys. 74:443 y Riddles *et al.* (1979) Anal. Biochem. 94:75).

En determinadas realizaciones, los polipéptidos quiméricos de la invención pueden producirse usando técnicas convencionales de química de proteínas tales como las descritas en Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlín (1993) y Grant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1992). Además, están disponibles en el mercado sintetizadores peptídicos automatizados (por ejemplo, Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Biosearch 9600). En cualquiera de los métodos anteriores de entrecruzamiento para la conjugación química de SAH a una proteína heteróloga, puede usarse un dominio escindible o conector escindible. La escisión permitirá la separación de la proteína heteróloga y el polipéptido SAH. Por ejemplo, después de la penetración de una célula por un polipéptido quimérico, la escisión del conector escindible permitiría la separación de SAH de la proteína heteróloga.

En determinadas realizaciones, los polipéptidos quiméricos de la presente invención pueden generarse como una proteína de fusión que contiene una parte de SAH y una proteína heteróloga (por ejemplo, un anticuerpo o un péptido terapéutico), expresada como una cadena polipeptídica contigua. Dichos polipéptidos quiméricos se mencionan en este documento como conjugados de forma recombinante. En la preparación de dichas proteínas de fusión, se construye un gen de fusión que comprende ácidos nucleicos que codifican una parte de SAH y una proteína heteróloga y, opcionalmente, una secuencia de conector peptídico para abarcar la parte de SAH y la proteína heteróloga. El uso de técnica de ADN recombinante para crear un gen de fusión, siendo el producto de traducción la proteína de fusión deseada, es bien conocido en la técnica. Tanto la secuencia codificante de un gen como sus regiones reguladoras pueden rediseñarse para cambiar las propiedades funcionales del producto proteínico, la cantidad de proteína generada o el tipo de célula en que se produce la proteína. La secuencia codificante de un gen puede alterarse ampliamente - por ejemplo, fusionando parte del mismo a la secuencia codificante de un gen diferente para producir un gen híbrido novedoso que codifique una proteína de fusión. Los ejemplos de métodos para producir proteínas de fusión se describen en las solicitudes PCT PCT/US87/02968, PCT/US89/03587 y PCT/LTS90/07335, así como Traunecker *et al.* (1989) Nature 339:68.

Esencialmente, la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias polipeptídicas se realiza de acuerdo con técnicas convencionales, empleando extremos con finales romos o finales escalonados para el ligamiento, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según lo apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar unión indeseable y ligamiento enzimático. Como alternativa, el gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales incluyendo sintetizadores automatizados de ADN. En otro método, puede realizarse amplificación por PCR de fragmentos génicos usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente pueden hibridarse para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel *et al.* John Wiley & Sons: 1992). Los polipéptidos quiméricos codificados por el gen de fusión pueden producirse de forma recombinante usando diversos sistemas de expresión que son bien conocidos en la técnica (véase también a continuación).

Los polipéptidos quiméricos conjugados de forma recombinante incluyen realizaciones en que la parte SAH se conjuga con el extremo N o el extremo C de la proteína heteróloga.

En algunas realizaciones, puede reducirse la inmunogenicidad del polipéptido quimérico identificando un epítipo de linfocito-T candidato dentro de una región de unión que abarca el polipéptido quimérico y cambiando un aminoácido dentro de la región de unión como se describe en publicación de patente de Estados Unidos n.º 2003/0166877.

La expresión proteína quimérica se usará para hacer referencia a proteínas que comprenden una parte de SAH (tal como un polipéptido variante de SAH) y una proteína heteróloga, independientemente de la manera que en estas partes se interconecten (por ejemplo, conjugadas químicamente, conjugadas de forma recombinante). Por tanto, las expresiones proteína quimérica, proteína de fusión y proteína conjugada se usarán indistintamente.

Las categorías ejemplares de proteínas heterólogas incluyen, aunque sin limitación, enzimas, factores de crecimiento y citocinas. En determinadas realizaciones, las proteínas heterólogas es un anticuerpo.

Las proteínas heterólogas para su uso en un polipéptido quimérico que comprende una parte de SAH pueden ser una proteína terapéutica o fragmentos de la misma, tales como factores de crecimiento, enzimas, proteínas morfogénicas óseas y fragmentos de receptor soluble. Los polipéptidos heterólogos ejemplares incluyen factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factores de crecimiento de nervios (NGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF; un miembro de la familia EGF de factores de crecimiento), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF; un miembro de la familia de FGF de factores de crecimiento), factores de crecimiento transformante (por ejemplo, TGF-alfa, TGF-beta, TGF-beta2, TGF-beta3), factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGF; por ejemplo, VEGF-2), interferones (por ejemplo, INF-alfa, INF-beta), interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2), citocinas e insulina. Otras proteínas heterólogas ejemplares incluyen enzimas. Otros polipéptidos heterólogos ejemplares incluyen proteínas morfogénicas óseas (BMP; un miembro de la familia BMP de proteínas), eritropoyetinas (EPO), miostatina y factores de necrosis tumoral (por ejemplo, TNF- α). Otros

polipéptidos heterólogos ejemplares incluyen dominios extracelulares de receptores transmembranarios, incluyendo cualquier dominio extracelular de origen natural de un receptor celular, así como cualquier variante del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas).

5 Las proteínas heterólogas para su uso en un polipéptido quimérico que comprende una parte de SAH pueden ser una proteína terapéutica o fragmentos de la misma, incluyendo un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos ejemplares y fragmentos de anticuerpo incluyen, aunque sin limitación, Humira®, Remicade®, Simponi®, Rituxan®, Herceptin®, Avastin®, Erbitux®; Synagis®, Mylotarg®, Campath®, TheraCIM®, Vectibix®, Tysabri®, ReoPro®, Lucentis®, Cimzia® y similares.

10

4.6 Ácidos nucleicos relacionados con SAH y expresión

En determinados aspectos, la divulgación proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos (por ejemplo, variantes de SAH y polipéptidos quiméricos con una parte de SAH) de la divulgación. Además, la presente invención hace uso de dichos ácidos nucleicos para producir un polipéptido quimérico o polipéptido variante de SAH (por ejemplo, parte de SAH - que incluye fragmentos bioactivos, variantes y fusiones de la misma). En determinadas realizaciones específicas, los ácidos nucleicos pueden comprender además ADN que codifica una proteína heteróloga (por ejemplo, un anticuerpo o un péptido terapéutico) para generar una proteína quimérica recombinante de la invención. Todos estos ácidos nucleicos se mencionan de forma colectiva como ácidos nucleicos de SAH.

En este documento se divulga una construcción de ácido nucleico, que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que codifica una parte de seroalbúmina humana (SAH), cuya parte de SAH comprende el dominio III de SAH, o un fragmento de unión a FcRn del mismo, cuyo dominio III de SAH comprende de una a dieciocho sustituciones de aminoácido, unido de forma funcional a (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga, en la que la construcción de ácido nucleico codifica un polipéptido quimérico que retiene una actividad funcional de la proteína heteróloga y puede unirse a un FcRn, y en el que dicho polipéptido quimérico tiene una semivida en suero y/o afinidad por FcRn aumentada respecto a un polipéptido quimérico de control en que la parte de SAH no incluye dichas sustituciones de aminoácido.

En determinadas realizaciones, el polipéptido quimérico codificado por la construcción de ácido nucleico de la invención se une a FcRn con una mayor afinidad que dicho polipéptido quimérico de control. En determinadas realizaciones, el polipéptido quimérico codificado por la construcción de ácido nucleico de la invención tiene una semivida en suero aumentada respecto a dicho polipéptido quimérico de control. En determinadas realizaciones, el polipéptido quimérico codificado por la construcción de ácido nucleico de la invención tiene estas dos propiedades.

En este documento se divulga una secuencia de nucleótidos que codifica una parte de seroalbúmina humana (SAH), cuya parte de SAH comprende el dominio III de SAH, o un fragmento de unión a FcRn del mismo, cuyo dominio III de SAH comprende de una a dieciocho (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18) sustituciones de aminoácido.

En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH codificadas por la construcción de ácido nucleico es de un resto que está conservado entre múltiples especies. En determinadas realizaciones, todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos que están conservados entre múltiple especies. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo. En determinadas realizaciones, todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos que están conservados entre proteínas seroalbúmina de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto accesible en la superficie. En determinadas realizaciones, todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos accesibles en la superficie. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está tanto accesible en la superficie como conservado entre múltiples especies. En determinadas realizaciones, todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos que están tanto accesibles en la superficie como conservados entre múltiple especies.

En determinadas realizaciones, (i) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio III de SAH al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 1. En determinadas realizaciones, (i) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio III de SAH al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1. En determinadas realizaciones, (i) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio III de SAH al menos un 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido está en el bucle 2 del dominio III de SAH. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido está en el bucle 3 del dominio III de SAH. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido está en

el bucle 6 del dominio III de SAH. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido está en la hélice 7 del dominio III de SAH. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido está en el bucle 7 del dominio III de SAH. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido está en la hélice 8 del dominio III de SAH. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido está en el bucle 8 del dominio III de SAH. En determinadas realizaciones, al menos una de dichas sustituciones de aminoácido está en el bucle 9 del dominio III de SAH.

En determinadas realizaciones, (ii) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga, cuya proteína heteróloga comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En determinadas realizaciones, (ii) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga, cuya proteína heteróloga comprende una proteína terapéutica.

En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos codifica además una región constante de una inmunoglobulina IgG.

En determinadas realizaciones, (ii) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga, cuya proteína heteróloga comprende un factor de crecimiento o una citocina. En determinadas realizaciones, la construcción de ácido nucleico comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica un conector.

Los ácidos nucleicos puede ser moléculas de ADN o ARN monocatenarias o bicatenarias. En determinadas realizaciones, la divulgación se refiere a secuencias de ácido nucleico aisladas o recombinantes que codifican una parte de SAH que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la misma región de una secuencia de SAH (por ejemplo, SEQ ID NO: 1 y 2). En realizaciones adicionales, las secuencias de ácido nucleico de SAH pueden estar aisladas, ser recombinantes y/o estar fusionadas con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o en una colección de ADN.

En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos de SAH también incluyen secuencias de nucleótidos que hibridan en condiciones altamente rigurosas con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SAH natural mencionada anteriormente o secuencias complementarias de la misma. Un experto en la materia entenderá fácilmente que pueden variarse las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación del ADN. Por ejemplo, podría realizarse la hibridación en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6,0 x a aproximadamente 45 °C, seguido por un lavado de SSC 2,0 x a 50 °C. Por ejemplo, la concentración salina en la etapa de lavado puede seleccionarse de una baja rigurosidad de aproximadamente SSC 2,0 x a 50 °C hasta una alta rigurosidad de aproximadamente SSC 0,2 x a 50 °C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentarse de condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, hasta condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65 °C. Tanto la temperatura como la salinidad pueden variarse, o la temperatura o la concentración salina pueden mantenerse constantes mientras se cambia la otra variable. En una realización, la invención proporciona ácidos nucleicos que hibridan en condiciones de baja rigurosidad de SSC 6 x a temperatura ambiente seguido por un lavado a SSC 2 x a temperatura ambiente.

Los ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos de SAH natural debido a la degeneración en el código genético también están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, varios aminoácidos están designados por más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimo (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos para histidina) pueden provocar mutaciones "silenciosas" que no afectan a la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que existan polimorfismos de secuencia de ADN que den lugar a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas objeto entre células de mamífero. Un experto en la materia apreciará que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente un 3-5 % de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular puedan existir entre individuos de una especie dada debido a variación alélica natural. Todas y cada una de estas variaciones de nucleótidos y polimorfismos resultantes de aminoácido están dentro del alcance de esta invención.

En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos de SAH recombinantes pueden unirse de forma funcional a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en una construcción de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladoras generalmente serán apropiadas para una célula hospedadora usada para la expresión. Se conocen numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas en la técnica para una diversidad de células hospedadoras. Normalmente, dicha una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, aunque sin limitación, secuencias promotoras, secuencias líder o señal, sitios de unión al ribosoma, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción y secuencias potenciadoras o activadoras. Se contemplan promotores constitutivos o inducibles conocidos en la técnica por la invención. Los promotores pueden ser promotores de origen natural o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Una construcción de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, tal como un plásmido, o la construcción de expresión puede insertarse en un cromosoma. En una realización preferida, el vector de expresión contiene un gen marcador de selección para permitir la selección de células hospedadoras transformadas. Los genes marcadores de selección son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula hospedadora usada. En determinados aspectos, esta invención se refiere a un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido SAH y unida de forma funcional

a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras están reconocidas en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido codificado. Por consiguiente, la expresión secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Las secuencias reguladoras ejemplares se describen en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar y/o el tipo de proteína deseada a expresar. Además, el número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de otra proteína cualquiera codificada por el vector, tal como marcadores antibióticos, también deben considerarse.

También se divulga en este documento una célula hospedadora transfectada con un gen recombinante que codifica un polipéptido SAH o un polipéptido quimérico de la invención. La célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido SAH o un polipéptido quimérico puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, usando un sistema de expresión de baculovirus), levadura o células de mamífero. Otras células hospedadoras adecuadas son conocidas para los expertos en la materia.

En este documento se divulgan además métodos de producción de un polipéptido SAH, una proteína heteróloga y/o un polipéptido quimérico de la invención. Por ejemplo, una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido SAH o un polipéptido quimérico puede cultivarse en condiciones apropiadas para permitir que se produzca la expresión del polipéptido. El polipéptido puede secretarse y aislarse de una mezcla de células y medio que contiene los polipéptidos. Como alternativa, los polipéptidos pueden retenerse en el citoplasma o en una fracción de membrana y recogerse las células, lisarse y aislarse la proteína. Un cultivo celular incluye células hospedadoras, medio y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos pueden aislarse del medio de cultivo celular, células hospedadoras o ambos usando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis y purificación por inmunofinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares de los polipéptidos (por ejemplo, un polipéptido SAH). El polipéptido puede ser una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación.

Un ácido nucleico de SAH recombinante puede producirse ligando el gen clonado, o una parte del mismo, en un vector adecuado para su expresión en células procariotas, células eucariotas (levadura, de ave, insecto o mamífero) o ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para la expresión en células procariotas, tales como *E. coli*. Los vectores de expresión de mamífero preferidos contienen tanto secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en bacterias como una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamífero adecuados para la transfección de células eucariotas.

Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y la selección por resistencia a fármacos tanto en células procariotas como en células eucariotas. Como alternativa, pueden usarse derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1) o el virus Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y la transformación de los organismos hospedadores son bien conocidos en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como para células eucariotas, así como los procedimientos de recombinación generales, véase Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2.^a Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Capítulos 16 y 17. En algunos casos, puede ser deseable expresar el polipéptido recombinante por el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Los ejemplos de dichos sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (tales como el pBlueBac III que contiene β -gal).

Las técnicas para generar genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias polipeptídicas se realiza de acuerdo con técnicas convencionales, empleando extremos con finales romos o finales escalonados para el ligamiento, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según lo apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar unión indeseable y ligamiento enzimático. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales incluyendo sintetizadores automatizados de ADN. Como alternativa, puede realizarse amplificación por PCR de fragmentos génicos usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente pueden hibridarse para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons: 1992).

4.7 Métodos de tratamiento

La siguiente sección incluye declaraciones respecto a métodos de tratamiento médico. Estas declaraciones se mantienen como pertinentes para los usos médicos y productos para uso médico que son parte de la invención y son como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento de afecciones que se pueden tratar usando la proteína heteróloga de las fusiones quiméricas de la divulgación. En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos de aumento de la semivida en suero y/o aumento de la afinidad de unión a FcRn de una proteína en un sujeto, que comprende conjugar dicha proteína a una parte de SAH, cuya parte de SAH comprende el dominio III o un fragmento de unión al receptor Fc neonatal (FcRn) del mismo. En este documento se divulga el dominio III de SAH que comprende de una dieciocho sustituciones de aminoácido para aumentar una o ambas de la afinidad por FcRn y la semivida en suero del polipéptido quimérico respecto a un polipéptido de control. Estos métodos implican administrar a un individuo que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido quimérico o variante de SAH como se describe anteriormente. En determinadas realizaciones, el método comprende administrar un polipéptido quimérico que comprende (a) una parte de SAH o fragmento bioactivo de la misma y (b) una proteína heteróloga. Estos métodos están particularmente dirigidos a tratamientos terapéuticos y profilácticos de animales, y más particularmente, seres humanos.

Obsérvese que las enfermedades y afecciones particulares que pueden tratarse dependen de la parte de proteína heteróloga de la proteína quimérica. Además, la divulgación contempla que pueden administrarse polipéptidos quiméricos que incluyen una proteína heteróloga apropiada para tratar una enfermedad o afección particular como parte de un régimen terapéutico junto con uno o más compuestos diferentes u otras modalidades terapéuticas apropiadas para tratar una enfermedad o afección particular. Además, La divulgación contempla que el polipéptido quimérico se administre de una manera coherente con el tratamiento medicamente apropiado dada la edad del paciente, peso, salud, gravedad de la enfermedad, etc.

A modo de ejemplo, si la proteína heteróloga es Humira, el polipéptido quimérico puede usarse en, por ejemplo, el tratamiento de artritis reumatoide, psoriasis, artritis juvenil y enfermedad de Crohn. Si la proteína heteróloga es insulina, el polipéptido quimérico puede usarse en, por ejemplo, el tratamiento con insulina.

Los términos "tratamiento", "tratar" y similares se usan en este documento para indicar en líneas generales la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención completa o parcial de una enfermedad, afección o síntomas de la misma, y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para una enfermedad o afección y/o efecto adverso que se puede atribuir a la enfermedad o afección. "Tratamiento", como se usa en este documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad o afección de un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) prevenir la aparición de la enfermedad o afección en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o afección, pero aún no se ha diagnosticado que la padece; (b) prevenir la enfermedad o afección (por ejemplo, detener su desarrollo); o (c) aliviar la enfermedad o afección (por ejemplo, causar la reversión de la enfermedad o afección, proporcionando una mejora en uno o más síntomas). Las mejoras en cualquier afección pueden evaluarse fácilmente de acuerdo con métodos convencionales y técnicas conocidas en la técnica. La población de sujetos tratados por el método de la enfermedad incluye sujetos que padecen la afección o enfermedad indeseable, así como sujetos en riesgo de desarrollar la afección o enfermedad.

Por la expresión "dosis terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se entiende una dosis que produce el efecto deseado para el que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento y la podrá averiguar un experto en la materia usando técnica conocidas (véase, por ejemplo, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

En determinadas realizaciones, puede administrarse uno o más polipéptidos quiméricos o variantes de SAH de la presente invención, juntos (simultáneamente) o en diferentes momentos (secuencialmente). Además, los polipéptidos quiméricos o variantes de SAH de la presente invención pueden administrarse en combinación con uno o más compuestos o tratamientos adicionales para tratar la misma enfermedad o síntoma. Por ejemplo, puede coadministrarse uno o más polipéptidos quiméricos o variantes de SAH junto con uno o más compuestos terapéuticos. El tratamiento de combinación puede abarcar la administración simultánea o alterna. Además, La combinación puede abarcar la administrar aguda o crónica. Opcionalmente, El polipéptido quimérico o variante de SAH de la presente invención y los compuestos adicionales actúan de una manera aditiva o sinérgica para tratar la enfermedad o síntoma. Los compuestos adicionales a usar en tratamientos de combinación incluyen, aunque sin limitación, moléculas pequeñas, polipéptidos, anticuerpos, oligonucleótidos de antisentido y moléculas de ARNip. Además, el tratamiento de combinación también incluye los métodos divulgados en este documento junto con otros tratamientos que no son de medicamento. Dependiendo de la naturaleza del tratamiento de combinación, la administración de los polipéptidos quiméricos o variantes de SAH de la invención puede continuarse mientras se administra el otro tratamiento y/o después de ello. La administración de los polipéptidos quimérica o variantes de SAH puede hacerse en una única dosis, o en múltiples dosis. En algunos casos, la administración de los polipéptidos quiméricos o variantes de SAH se comienza al menos varios días antes del otro tratamiento, mientras que en otros

casos, la administración se comienza inmediatamente antes o en el momento de la administración del otro tratamiento.

4.8 Métodos de administración

En determinadas realizaciones, la administración a dicho sujeto comprende administrar la variante de SAH o el polipéptido quimérico de forma sistémica. En determinadas realizaciones, la administración a dicho sujeto comprende administrar la variante de SAH o el polipéptido quimérico por vía oral. En determinadas realizaciones, la administración a dicho sujeto comprende administrar dicha variante de SAH o el polipéptido quimérico por vía intravenosa.

En determinados aspectos, la divulgación proporciona una composición que comprende la variante de SAH o el polipéptido quimérico de la divulgación, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, la composición es una composición estéril. En determinadas realizaciones, la composición es apirógena.

Se conocen diversos sistemas de suministro y pueden usarse para administrar los polipéptidos quiméricos o variantes de SAH de la divulgación, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes que pueden expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Los métodos de introducción pueden ser enterales o parenterales, incluyendo aunque sin limitación, vía intradérmica, transdérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, pulmonar, intranasal, intraocular, epidural, tópica y oral. En realizaciones particulares, la introducción parenteral incluye administración intramuscular, subcutánea, intravenosa, intravascular e intrapericárdica.

Los polipéptidos quiméricos o variantes de SAH pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., mucosa oral, rectal y mucosa intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Se puede emplear también la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de formación de aerosol.

En determinadas realizaciones, puede ser deseable administrar los polipéptidos quiméricos o variantes de SAH de la invención de forma local al área que necesita tratamiento (por ejemplo, músculo); Esto puede conseguirse, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local durante cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, por inyección, mediante un catéter o mediante un implante, siendo el implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, fibras o sustitutos comerciales de piel.

En otras realizaciones, Los polipéptidos quiméricos o variantes de SAH de la divulgación pueden suministrarse en una vesícula, en particular, un liposoma (véase, Langer, 1990, Science 249:1527-1533). En otra realización más, los polipéptidos quiméricos o variantes de SAH de la divulgación pueden suministrarse en un sistema de liberación controlada. En otra realización, puede usarse una bomba (véase Langer, 1990, *supra*). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos (véase, Howard *et al.*, 1989, J. Neurosurg. 71:105). En determinadas realizaciones específicas, los polipéptidos quiméricos o variantes de la divulgación pueden suministrarse por vía intravenosa.

En determinadas realizaciones, los polipéptidos quiméricos o variantes de SAH se administran por infusión intravenosa. En determinadas realizaciones, los polipéptidos quiméricos o variantes de SAH se infunden durante un periodo de al menos 10, al menos 15, al menos 20 o al menos 30 minutos. En otras realizaciones, los polipéptidos quiméricos o variantes de SAH se infunden durante un periodo de al menos 60, 90 o 120 minutos. Independientemente del periodo de infusión, la divulgación contempla que cada infusión sea parte de un plan de tratamiento global donde el polipéptido quimérico o variante de SAH se administra de acuerdo con una pauta regular (por ejemplo, semanalmente, mensualmente, etc.).

4.9 Métodos de evaluación

Los polipéptidos quiméricos de la divulgación se caracterizan basándose en (i) la retención sustancial de una función de la proteína heteróloga y (ii) la posesión de afinidad aumentada por FcRn y/o semivida en suero aumentada respecto a un polipéptido quimérico conjugado con una parte de SAH no modificada o respecto a otro control apropiado. En este documento se divulgan polipéptidos variante de SAH caracterizados basándose en la posesión de afinidad aumentada por FcRn y/o semivida en suero aumentada respecto a una parte de SAH natural o respecto a otro control apropiado. Las propiedades de un polipéptido quimérico o polipéptido variante de SAH pueden evaluarse en uno cualquiera o más ensayos adecuados, *in vitro* o *in vivo*.

A modo de ejemplo, la afinidad (K_a y/o K_d) por FcRn puede evaluarse *in vitro* usando, por ejemplo, uno cualquiera o más de los ensayos descritos en los ejemplos u otros ensayos de unión. Asimismo, la k_{off} y/o k_{on} puede evaluarse *in vitro* usando, por ejemplo, uno cualquiera o más de los ensayos descritos en los ejemplos u otros ensayos de unión.

La medición de la constante de afinidad y la especificidad de unión entre el antígeno y el anticuerpo es un elemento central en la determinación de la eficacia de los métodos terapéuticos, de diagnóstico y de investigación usando los

anticuerpos anti-SAH. "Afinidad de unión" en general se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo, una parte de SAH) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno, un FcRn). Salvo que se indique lo contrario, como se usa en este documento, la "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede estar representada en general por la constante de disociación en equilibrio (K_d o K_D), que se calcula como la relación k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen, Y., *et al.*, (1999) J. Mol Biol 293:865-881. La afinidad puede medirse por métodos habituales conocidos en la técnica, incluyendo los descritos y ejemplificados en este documento, tales como BIAcore. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos durante más tiempo. Se conoce una diversidad de métodos de medición de la afinidad de unión en la técnica, cualquiera de los cuales puede usarse para los fines de la presente invención.

En determinadas realizaciones, el polipéptido quimérico o polipéptido de SAH variante tiene una afinidad por FcRn que está mejorada en aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 4 o aproximadamente 5 veces respecto a la del control. En determinadas realizaciones, el polipéptido quimérico tiene una afinidad que está mejorada en más de 5, o incluso más de 10 veces respecto a la del control. En determinadas realizaciones, el polipéptido quimérico o polipéptido variante de SAH tiene una afinidad que está mejorada en más de 20, 25, 40 o más de 50 veces respecto a la del control. En determinadas realizaciones, el polipéptido quimérico o polipéptido variante de SAH tiene una afinidad que está mejorada en aproximadamente 5-10 veces, aproximadamente 10-20 veces, aproximadamente 25-40 veces, aproximadamente 40-50 veces, aproximadamente 50-75 o aproximadamente 75-100 veces respecto a la del control. Cuando se evalúa la afinidad calculando la K_a , estas mejoras de afinidad se traducen en un aumento en la K_a (por ejemplo, 2 veces, 5 veces, 10 veces, etc., como se resume anteriormente). Cuando se evalúa la afinidad calculando la K_d , estas mejoras de afinidad se traducen en una disminución en la K_d (por ejemplo, 2 veces, 5 veces, 10 veces, etc., como se resume anteriormente).

En determinadas realizaciones, la afinidad por FcRn a bajo pH (por ejemplo, pH ~5,5) está mejorada. En otras determinadas realizaciones, la afinidad por FcRn a bajo pH está mejorada y la afinidad a pH neutro (por ejemplo, pH ~7,2) está inalterada.

A modo de ejemplo adicional, la semivida en suero puede medirse en un ser humano o modelo animal. Un aumento en la semivida en suero en cualquier modelo animal (incluyendo, aunque sin limitación, un animal transgénico que tiene un FcRn humano) es suficiente para caracterizar un polipéptido quimérico o variante de SAH como que tiene un aumento en la semivida en suero respecto a un control.

En una realización, el polipéptido quimérico o polipéptido variante de SAH tiene una semivida en sangre no menor de 10 días, preferiblemente no menos de aproximadamente 14 días y mucho más preferiblemente no menos de un 50 % de la semivida de la proteína seroalbúmina natural u homólogo de la misma. En otra realización, la semivida del polipéptido quimérico o polipéptido variante de SAH está aumentada en aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 4 o aproximadamente 5 veces respecto a la del polipéptido de control. En determinadas realizaciones, la semivida del polipéptido quimérico o polipéptido variante de SAH está aumentada en más de 5, o incluso más de 10 veces respecto a la del polipéptido de control. En determinadas realizaciones, la semivida del polipéptido quimérico o polipéptido variante de SAH está aumentada en más de 20, 25, 40 o más de 50 veces respecto a la del polipéptido de control. En determinadas realizaciones, la semivida del polipéptido quimérico o polipéptido variante de SAH está aumentada en aproximadamente 5-10 veces, aproximadamente 10-20 veces, aproximadamente 25-40 veces, aproximadamente 40-50 veces, aproximadamente 50-75 o aproximadamente 75-100 veces respecto a la del polipéptido de control.

Los ensayos adecuados para evaluar si un polipéptido quimérico retiene sustancialmente una función de la proteína heteróloga dependerá de la proteína heteróloga y su función natural. Sin embargo, la función puede evaluarse en cualquier ensayo *in vitro* o *in vivo* apropiado, incluyendo modelos animales. Las funciones ejemplares incluyen, aunque sin limitación, (i) la capacidad de unirse a un receptor particular; (ii) la capacidad de inducir o inhibir la señalización mediante una ruta de transducción de señales particular; (iii) la capacidad de inducir o inhibir la apoptosis; (iv) la capacidad de inducir o inhibir la angiogénesis; (v) la capacidad de estimular o inhibir la proliferación celular; (vi) la capacidad de promover o inhibir la diferenciación celular; (vii) la capacidad de promover la supervivencia celular; y (viii) la capacidad de promover o inhibir la secreción de otro factor proteínico.

En determinadas realizaciones, un polipéptido quimérico de la presente divulgación que comprende una proteína heteróloga biológicamente activa es más potente que la propia proteína heteróloga biológicamente activa, por ejemplo, no fusionada a una parte de SAH. Por ejemplo, un polipéptido quimérico puede ser 2 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 25 veces, 50 veces, 100 veces o incluso 1000 veces más activo que la secuencia de la proteína biológicamente activa en solitario, por ejemplo, 1, 2 o incluso 3 órdenes de magnitud más activo. Por tanto, en realizaciones en las que la secuencia del péptido biológicamente activo inhibe una actividad biológica, la CI_{50} del polipéptido quimérico puede ser 10 veces inferior, 100 veces inferior o incluso 1000 veces inferior que la CI_{50} de la proteína biológicamente activa en solitario, y en realizaciones en las que la secuencia de la proteína biológicamente activa induce o promueve la actividad biológica, la CE_{50} del polipéptido quimérico puede ser 10 veces inferior, 100

5 veces inferior o incluso 1000 veces inferior que la CE_{50} del péptido biológicamente activo en solitario. En realizaciones en las que la secuencia de la proteína biológicamente activa se une a una molécula biológica, tal como un ácido nucleico, péptido o carbohidrato, la constante de disociación K_d del polipéptido quimérico y la molécula biológica a la que se une puede ser 10 veces inferior, 100 veces inferior o incluso 1000 veces inferior que la K_d de la molécula biológica y la proteína biológicamente activa en solitario, por ejemplo, la unión de las dos entidades se ve favorecida de forma creciente sobre su disociación.

4.10 Composiciones farmacéuticas

10 En determinadas realizaciones, los presente polipéptidos quiméricos o variantes de SAH de la presente divulgación se formulan con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Puede administrarse uno o más polipéptidos quiméricos variantes de SAH en solitario o como un componente de una formulación farmacéutica (composición). Los polipéptidos quiméricos o variantes de SAH pueden formularse para administración de cualquier manera conveniente para su uso en medicina humana o veterinaria. También pueden estar presentes en las composiciones
15 agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como lauril sulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes.

20 Las formulaciones de los presente polipéptidos quiméricos variantes de SAH incluyen aquellos adecuados para administración oral, nasal, tópica, parenteral, rectal y/o intravaginal. Las formulaciones pueden estar presentes convenientemente en forma monodosis y pueden prepararse por cualquier método bien conocido en la técnica de farmacia. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del hospedador que se está tratando y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir
25 una forma de dosificación individual generalmente será esa cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico.

30 En determinadas realizaciones, los métodos de preparación de estas formulaciones o composiciones incluyen combinar otro tipo de agentes terapéuticos y un vehículo y, opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones pueden prepararse con un vehículo líquido o un vehículo sólido dividido finamente, o ambos, y después, si fuera necesario, conformando el producto.

35 Las formulaciones para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sobrecitos, píldoras, comprimidos, grageas (usando una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábiga o de tragacanto), polvos, gránulos o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como colutorios y similares, que contienen cada uno una cantidad determinada de uno de los presente agentes terapéuticos polipeptídicos como ingrediente activo. Las suspensiones,
40 además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y goma de tragacanto, y mezclas de los mismos.

45 En formas sólidas de dosificación para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), puede mezclarse uno o más agentes terapéuticos polipeptídicos de la presente invención con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o diluyentes, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, determinados silicatos y carbonato de sodio; (5)
50 agentes retardadores de disolución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcillas de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como rellenos en cápsulas de gelatina de relleno blando y duro usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas líquidas de dosificación para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas líquidas de dosificación pueden contener
60 diluyentes inertes habitualmente usados en la técnica, tales como agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceite de algodón, de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, edulcorantes,
65 aromatizantes, coloración, perfumantes y agentes conservantes.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden comprender uno o más polipéptidos quiméricos o variantes de SAH en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del destinatario pretendido o agentes de suspensión o espesantes. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de dispersión. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse por la inclusión de agentes que retardan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

En determinadas realizaciones, las composiciones de la divulgación, incluyendo composiciones farmacéuticas, son apirógenas. En otras palabras, en determinadas realizaciones, las composiciones están sustancialmente libres de pirógenos. En una realización, las formulaciones de la invención son formulaciones libres de pirógenos que están sustancialmente libres de endotoxinas y/o sustancias pirógenas relacionadas. Las endotoxinas incluyen toxinas que están confinadas dentro de un microorganismo y se liberan únicamente cuando los microorganismos se descomponen o mueren. Las sustancias pirógenas también incluyen sustancias termoestables que inducen fiebre (glucoproteínas) de la membrana exterior de bacterias y otros microorganismos. Estas dos sustancias pueden causar fiebre, hipotensión y choque si se administran a seres humanos. Debido a los efectos dañinos potenciales, incluso bajas cantidades de endotoxinas deben retirarse de las soluciones de principio activo farmacéutico administradas por vía intravenosa. La Food & Drug Administration ("FDA") ha establecido un límite superior de 5 unidades de endotoxina (UE) por dosis por kilogramo de peso corporal en un periodo de una única hora para aplicaciones de fármacos intravenosos (The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26 (1):223 (2000)). Cuando se administran proteínas terapéuticas en cantidades de varios cientos o miles de miligramos por kilogramo de peso corporal, como puede ser caso con anticuerpos, deben retirarse incluso cantidades mínimas de endotoxina dañina y peligrosa. En determinadas realizaciones específicas, los niveles de endotoxina y pirógenos en la composición son de menos de 10 UE/ml, o menos de 5 UE/mg, o menos de 1 UE/mg, o menos de 0,1 UE/mg o menos de 0,01 UE/mg o menos de 0,001 UE/mg.

Las formas inyectables de depósito se generan formando matrices de microencapsulación de uno o más agentes terapéuticos polipeptídicos en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la relación de fármaco a polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la tasa de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que con compatibles con el tejido corporal.

En determinadas realizaciones, los polipéptidos quiméricos o variantes de SAH de la presente divulgación se formulan de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Cuando es necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Cuando la composición tiene que administrarse por infusión, puede distribuirse con un frasco de infusión que contiene agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes pueden mezclarse antes de la administración.

La cantidad de los polipéptidos quiméricos o variantes de SAH de la divulgación que será eficaz en el tratamiento de una afección o enfermedad relacionada con el tejido puede determinarse por técnicas clínicas convencionales. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos óptimos de dosificación. La dosis precisa a emplear en la formulación también dependerá de la vida de administración y la gravedad de la afección, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del facultativo y las circunstancias de cada paciente. Sin embargo, los intervalos adecuados de dosificación para administración intravenosa generalmente son de aproximadamente 20-5000 microgramos del polipéptido quimérico variante de SAH activo por kilogramo de peso corporal. Los intervalos adecuados de dosificación para administración intranasal generalmente son de aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal. Las dosis eficaces pueden extrapolarse de curvas de respuesta a dosis obtenidas de sistemas de ensayo *in vitro* o en modelo animal.

4.11 Artículos de fabricación y kits

En este documento se divulga un paquete farmacéutico o kit que comprende uno o más recipientes llenados con al menos un polipéptido quimérico o variante de SAH de la divulgación. La formulaciones de la divulgación pueden comprender polipéptidos quiméricos o variantes de SAH fusionados de forma recombinante o conjugados químicamente a otro resto, incluyendo aunque sin limitación, un proteína heteróloga, un polipéptido heterólogo, un péptido heterólogo, una molécula grande, una molécula pequeña, una secuencia marcadora, un agente de diagnóstico detectable, un resto terapéutico, un resto de fármaco, un ion metálico radiactivo, un segundo anticuerpo y un soporte. Las formulaciones de la divulgación pueden formularse en viales de una única dosis como un líquido estéril. Las formulaciones de la divulgación pueden suministrarse en viales ámbar de borosilicato de tipo I USP de 3 cc (West Pharmaceutical Serices - n.º de Parte 6800-0675) con un volumen diana de 1,2 ml. Los recipientes ejemplares incluyen, aunque sin limitación, viales, frascos, jeringas precargadas, bolsas IV, envases alveolados (que comprenden una o más píldoras). Opcionalmente asociado con dicho recipiente o recipientes puede haber un aviso en forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de agentes farmacéuticos o productos biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para diagnóstico y/o administración a seres humanos.

En este documento también se divulgan kits que comprenden polipéptidos quiméricos o variantes de SAH que son útiles con diversos fines, por ejemplo, aumentar la semivida en suero o aumentar la afinidad de unión a FcRn de un agente terapéutico. Para el aislamiento y purificación de un reactivo, el kit puede contener polipéptidos acoplados a microesferas (por ejemplo, microesferas de sepharose). Pueden proporcionarse kits que contienen los polipéptidos para detección y cuantificación de una diana *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia de Western. Como con el artículo de fabricación, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. El recipiente aloja una composición que comprende al menos un polipéptido quimérico o variante de SAH de la divulgación. Pueden incluirse recipientes adicionales que contienen, por ejemplo, diluyentes y tampones, reactivos de diagnóstico de control. La etiqueta o prospecto puede proporcionar una descripción de la composición, así como instrucciones para el uso pretendido *in vitro* o de diagnóstico.

4.12 Vectores adenovíricos y métodos

Los vectores de ADN útiles para la generación de partículas adenovíricas recombinantes a partir de células hospedadoras son bien conocidos en la técnica y hay fácilmente disponibles reactivos comerciales (véanse, por ejemplo, los n.º de Catálogo V493-20 y V494-20 de Invitrogen). En este documento se divulga un método para potenciar la generación de adenovirus recombinante incorporando una secuencia OriP en un vector de ADN útil para la generación de partículas adenovíricas (también mencionadas en esta ocasión como vectores adenovíricos). Los vectores adenovíricos que contienen OriP pueden comprender además secuencias para la expresión de la proteína EBNA-1 o, como alternativa, se usan células hospedadoras que expresan la proteína EBNA-1 para la generación de partículas adenovíricas recombinantes. Las vectores adenovíricos que contienen OriP son particularmente útiles para la generación de poblaciones de adenovirus recombinante que comprenden una colección diversa/compleja de secuencias de ADN de interés (por ejemplo, secuencias de ADN que codifican variantes del dominio III de SAH).

Una secuencia OriP puede genomanipularse fácilmente en cualquier vector adenovírico conocido usando numerosas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, si se utiliza un sistema de recombinación Gateway, la secuencia OriP debe estar ubicada entre los sitios de recombinación *att* del vector de entrada o el vector de destino adenovírico. Cuando se añaden secuencias a un vector adenovírico debe tenerse cuidado de evitar insertarlas en un sitio que impediría la replicación o ensamblaje del ADN adenovírico. Como alternativa, u opcionalmente, el vector adenovírico que contiene la secuencia OriP puede genomanipularse para que también exprese la proteína EBNA-1 (véase la figura 10). Expresando la proteína EBNA-1 directamente desde el vector adenovírico, la célula hospedadora no tiene que expresar el gen de EBNA-1.

Los vectores adenovíricos de la invención comprenden una secuencia OriP y secuencias genómicas adenovíricas.

Los vectores adenovíricos de la invención pueden comprender además uno o más de los siguientes elementos:

- (i) Uno o más sitios de recombinación (por ejemplo attR1 y attR2) para la clonación por recombinación con otro vector, dicho sitio es útil para lograr la clonación de secuencias de ADN de interés para su expresión en un adenovirus recombinante generado a partir del presente vector;
- (ii) Uno o más genes de resistencia a antibióticos/fármacos (por ejemplo, cloranfenicol) y/o un gen de expresión de toxina (por ejemplo ccdB) útil para la selección y/o contraselección;
- (iii) Sitio de clonación (puede ser un sitio de clonación múltiple) útil para subclonar una secuencia de ADN de interés;
- (iv) ADN de interés que puede comprender uno o más genes de interés que codifican una o más proteínas de interés;
- (v) Promotor para la expresión de un gen de interés en una amplia gama de células de mamífero (por ejemplo promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) humano), el promotor puede ser constitutivo o puede ser inducible;

(vi) Marca epitópica (por ejemplo, epítipo His6X) para la detección y/o purificación de la proteína de interés. La marca epitópica puede estar presente en el extremo 5' o 3' de la proteína recombinante de interés;

(vii) Secuencia de poliadenilación (poliA) (por ejemplo, secuencia poliA del virus 40 de simio) para la terminación eficaz de la transcripción y la poliadenilación del ARNm;

5 (viii) Origen de replicación para replicación de elevado número de copias y el manteniendo del plásmido en *E. coli*;

(ix) Gen de resistencia a antibióticos para la selección en *E. coli*;

(x) Uno o más sitios para enzimas de restricción (por ejemplo, PaeI) para linealizar el vector, los sitios para enzimas de restricción pueden flanquear los elementos (viii) y (ix); y

10 (xi) secuencia de ADN que codifica la proteína EBNA-1.

El origen del virus de Epstein-Barr (EBV) de síntesis del ADN plasmídico, oriP, mantiene de forma eficaz la síntesis del ADN en una diversidad de células eucariotas superiores. Se proporciona una secuencia OriP representativa en la figura 9C. Este origen usan únicamente una proteína vírica, EBNA-1, mientras que todos los demás factores se proporcionan por la célula. La proteína EBNA-1 puede proporcionarse por la célula hospedadora (por ejemplo, células 293E). Los vectores adenovíricos de la invención pueden comprender además el elemento (xi) secuencia de ADN que codifica la proteína EBNA-1. La proteína EBNA-1 representativa y las secuencias de ADN se proporcionan en las figuras 9A y 9B, respectivamente.

20 Se contempla específicamente que las secuencias genómicas adenovíricas (por ejemplo, las secuencias de adenovirus humano de tipo 5 codificarán genes y otros elementos (por ejemplo, repeticiones terminales invertidas (ITR) derecha e izquierda, secuencia señal de encapsidación, genes tardíos) necesarios para el empaquetado apropiado y la producción del adenovirus (Hitt *et al.*, 1999, *The Development of Human Gene Therapy*, T. Friedmann, ed. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pág. 61-86; Russell, 2000, *J. Gen. Virol.* 81, 2573-2604). Las secuencias genómicas adenovíricas pueden codificar un genoma adenovírico completo. Como alternativa, las secuencias genómicas adenovíricas pueden codificar todas las proteínas y otros elementos reguladores excepto una o más proteínas y/o elementos reguladores, que se proporcionan en trans, para producir adenovirus incompetente en la replicación. Por ejemplo, la región E1 que codifica las proteínas E1 (E1a y E1b) puede excluirse de los vectores adenovíricos de la invención (Russell, 2000, *J. Gen. Virol.* 81, 2573-2604). Las proteínas perdidas y/u otros elementos entonces se proporcionarán en trans, generalmente por el hospedador usado para generar los adenovirus, por ejemplo, las líneas celulares 293 contienen una copia genómica de la región E1. Las secuencias genómicas adenovíricas pueden comprender, o consistir esencialmente en secuencias de adenovirus humano de tipo 5 correspondientes a las secuencias de tipo silvestre 1-458 y 3513-35935.

35 Un experto en la materia entenderá que se proporcionarán determinados elementos en combinación y/o pueden incorporar otros elementos, por ejemplo, el elemento (iv) puede incorporar los elementos (v)-(vii). Se entenderá además que determinados elementos se proporcionarán 5' y/o 3' a otros elementos, por ejemplo, el elemento (x) puede ser útil para la linealización del vector adenovírico, el elemento (x), cuando se incorpora para la linealización, debe proporcionarse 5' a la ITR5' y/o 3' a la ITR3'. Asimismo, el elemento (viii) y (ix), cuando están presentes, generalmente están ubicados de modo que no se incorporarán en el adenovirus rescatado, por ejemplo, estos elementos pueden estar ubicados 5' a la ITR5' y 3' a la ITR3'. El OriP y los elementos (i)-(vii), si están presentes, están flanqueados en un lado por una secuencia genómica adenovírica que incluye la ITR 3' y por una secuencia ITR 5' en el otro lado (por ejemplo, figura 10).

45 Un vector adenovírico representativo de la invención que incorpora los elementos (i), (ii), (iv), (viii)-(x) y opcionalmente (xi) se proporciona en la figura 10.

5. Se describen en este documento:

50 1. Un polipéptido quimérico que comprende: (a) una parte de seroalbúmina humana (SAH), cuya parte de SAH comprende el dominio III de SAH o un fragmento de unión al receptor Fc neonatal (FcRn) del mismo, y (b) una proteína heteróloga, en el que el polipéptido quimérico retiene una actividad funcional de la proteína heteróloga y puede unirse a un FcRn, y en el que dicho dominio III de SAH comprende de una a dieciocho sustituciones de aminoácido para aumentar una o ambas de la afinidad por FcRn y semivida en suero del polipéptido quimérico respecto a un polipéptido quimérico de control en que la parte de SAH no incluye dichas sustituciones de aminoácido.

2. El polipéptido quimérico del punto 1, en el que el polipéptido quimérico se une a FcRn con una mayor afinidad que dicho polipéptido quimérico de control.

3. El polipéptido quimérico del punto 1 o 2, en el que el polipéptido quimérico se une a FcRn con una mayor afinidad que dicho polipéptido quimérico de control, y en el que dicha afinidad se mide a pH ácido.

4. El polipéptido quimérico del punto 3, en el que el pH ácido es entre 5,0 y 6,0.

5. El polipéptido quimérico del punto 4, en el que el pH ácido es $5,5 \pm 0,2$.

6. El polipéptido quimérico de uno cualquiera de los puntos 1-3, en el que el polipéptido quimérico se une a FcRn con una mayor afinidad que dicho polipéptido quimérico de control a pH ácido, pero dicho polipéptido quimérico no se une a FcRn con mayor afinidad que dicho polipéptido quimérico de control a pH neutro.

7. El polipéptido quimérico del punto 6, en el que el pH neutro es entre 6,9 y 7,9.

8. El polipéptido quimérico del punto 7, en el que el pH neutro es $7,4 \pm 0,2$.
9. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-6, en el que el polipéptido quimérico se une a FcRn y tiene una tasa de inactivación y una tasa de activación que difieren de las de dicho polipéptido quimérico de control.
- 5 10. El polipéptido quimérico del punto 9, en el que el polipéptido quimérico se une a FcRn y tiene, respecto a dicho polipéptido de control, una tasa de activación aumentada y/o una tasa de inactivación disminuida.
11. El polipéptido quimérico del punto 9, en el que el polipéptido quimérico se une a FcRn y tiene, respecto a dicho polipéptido de control, una tasa de inactivación aumentada.
- 10 12. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-11, en el que el dominio III de SAH comprende de una o diez sustituciones de aminoácido para aumentar la semivida en suero del polipéptido quimérico respecto al polipéptido quimérico de control en que la parte de SAH no incluye dichas sustituciones de aminoácido.
13. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-12, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está conservado entre múltiples especies.
- 15 14. El polipéptido quimérico del punto 13, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos que están conservados entre múltiples especies.
15. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-13, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo.
- 20 16. El polipéptido quimérico del punto 15, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos que están conservados entre proteínas seroalbúmina de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo.
17. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-15, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH se selecciona de las enumeradas en la tabla 5.
- 25 18. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-15, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa (SEQ ID NO: 2): resto 381, resto 383, resto 391, resto 401, resto 402, resto 407, resto 411, resto 413, resto 414, resto 415, resto 416, resto 424, resto 426, resto 434, resto 442, resto 445, resto 447, resto 450, resto 454, resto 455, resto 456, resto 457, resto 459, resto 463, resto 495, resto 506, resto 508, resto 509, resto 511, resto 512, resto 515, resto 516, resto 517, resto 519, resto 521, resto 523, resto 524, resto 525, resto 526, resto 527, resto 531, resto 535, resto 538, resto 539, resto 541, resto 557, resto 561, resto 566, resto 569.
- 30 19. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-15, en el que el polipéptido quimérico comprende sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH en las posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa, seleccionadas del grupo que consiste en: (a) restos 383 y 413; (b) restos 401 y 523; (c) restos 407 y 447; (d) restos 407 y 539; (e) restos 407 y 509; (f) restos 407 y 526; (g) restos 411 y 535; (h) restos 414 y 456; (i) restos 415 y 569; (j) restos 426 y 526; (k) restos 442 y 450 y 459; (l) restos 463 y 508; (m) restos 508 y 519 y 525; (n) restos 509 y 527; (o) restos 523 y 538; (p) restos 526 y 557; y (q) restos 541 y 561.
- 35 20. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-15 o 18, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH se selecciona del grupo que consiste en: V381N, V381Q, E383A, E383G, E383I, E383L, E383V, N391A, N391G, N391I, N391L, N391V, Y401D, Y401E, K402A, K402G, K402I, K402L, K402V, L407F, L407N, L407Q, L407W, L407Y, Y411Q, Y411N, K413C, K413S, K413T, K414S, K414T, V415C, V415S, V415T, Q416H, Q416P, V424A, V424G, V424I, V424L, V424N, V424Q, V426D, V426E, V426H, V426P, G434C, G434S, G434T, E442K, E442R, R445F, R445W, R445Y, P447S, P447T, E450D, E450E, S454C, S454M, S454T, V455N, V455Q, V456N, V456Q, L457F, L457W, L457Y, Q459K, Q459R, L463N, L463Q, E495D, T506F, T506W, T506Y, T508K, T508R, T508S, F509C, F509I, F509L, F509M, F509V, F509W, F509Y, A511F, A511W, A511Y, D512F, D512W, D512Y, T515C, T515H, T515N, T515P, T515Q, T515S, L516F, L516S, L516T, L516W, L516Y, S517C, S517F, S517M, S517T, S517W, S517Y, K519A, K519G, K519I, K519L, K519V, R521F, R521W, R521Y, I523A, I523D, I523E, I523F, I523G, I523I, I523K, I523L, I523N, I523Q, I523R, I523V, I523W, I523Y, K524A, K524G, K524I, K524L, K524V, K525A, K525G, K525I, K525L, K525V, Q526C, Q526M, Q526S, Q526T, Q526Y, T527F, T527W, T527Y, E531A, E531G, E531I, E531L, E531V, H535D, H535E, H535P, K538F, K538W, K538Y, A539I, A539L, A539V, K541F, K541W, K541Y, K557A, K557G, K557I, K557L, K557V, A561F, A561W, A561Y, T566F, T566W, T566Y, A569H y A569P.
- 45 21. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-15, 18 o 20, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH se selecciona del grupo que consiste en: V381N, E383G, N391V, Y401E, K402A, L407N, L407Y, Y411Q, K414S, K413S, V415T, V415C, Q416P, V424I, V424Q, V426E, V426H, G434C, E442K, R445W, P447S, E450D, S454C, V455N, V456N, L457F, Q459R, L463N, E495D, T506Y, T508R, T508S, F509I, F509M, F509W, A511F, D512Y, T515P, T515Q, T515S, L516T, L516W, S517C, S517W, K519I, R521W, I523D, I523E, I523Q, I523K, I523G, I523R, I523Y, K524L, K524V, K525V, Q526T, Q526M, Q526Y, T527Y, E531I, H535N, H535P, K538Y, A539I, K541F, K557G, A561F, T566W y A569P.
- 60 22. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-15 o 18, en el que el polipéptido quimérico comprende una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH seleccionada del grupo que consiste en: V381N, E383G, N391V, Y401E, K402A, L407N, L407Y, Y411Q, K414S, K413S, V415T, V415C, Q416P, V424I, V424Q, V426E, V426H, G434C, E442K, R445W, P447S, E450D, S454C, V455N, V456N, L457F, Q459R, L463N, E495D, T506Y, T508R, T508S, F509I, F509M, F509W, A511F, D512Y, T515P, T515Q, T515S, L516T, L516W, S517C, S517W,
- 65

K519I, R521W, I523D, I523E, I523Q, I523K, I523G, I523R, I523Y, K524L, K524V, K525V, Q526T, Q526M, Q526Y, T527Y, E531I, H535N, H535P, K538Y, A539I, K541F, K557G, A561F, T566W y A569P.

23. El polipéptido quimérico del punto 21, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH se selecciona del grupo que consiste en: L407N, L407Y, V415T, V424I, V424Q, V426E, V426H, P447S, V455N, V456N, L463N, E495D, T506Y, T508R, F509M, F509W, A511F, D512Y, T515Q, L516T, L516W, S517W, R521W, I523D, I523E, I523G, I523K, I523R, K524L, Q526M, T527Y, H535P y K557G.

24. El polipéptido quimérico del punto 22, en el que el polipéptido quimérico comprende una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH seleccionada del grupo que consiste en: L407N, L407Y, V415T, V424I, V424Q, V426E, V426H, P447S, V455N, V456N, L463N, E495D, T506Y, T508R, F509M, F509W, A511F, D512Y, T515Q, L516T, L516W, S517W, R521W, I523D, I523E, I523G, I523K, I523R, K524L, Q526M, T527Y, H535P y K557G.

25. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-14 o 18, en el que el polipéptido quimérico comprende sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH seleccionadas del grupo que consiste en: (a) E383G/K413S; (b) Y401E/I523G, (c) L407N/P447S; (d) L407N/P447S/A539I; (e) L407N/F509M; (f) L407Y/Q526T; (g) Y411Q/H535N; (h) K414S/V456N; (i) V415T/A569P; (j) V426H/Q526Y; (k) E442K/E450D/Q459R; (l) L463N/T508R; (m) T508R/K519I/K525V; (n) F509I/T527Y; (o) I523Q/K538Y; (p) Q526M/K557G; y (q) K541F/A561F.

26. El polipéptido quimérico del punto 25, en el que el polipéptido quimérico comprende sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH seleccionadas del grupo que consiste en: (a) L407N/P447S; (b) L407N/P447S/A539I; (c) L407N/F509M; (d) Y411Q/H535N; (e) K414S/V456N; (f) V426H/Q526Y; (g) L463N/T508R; (h) F509I/T527Y; (i) I523Q/K538Y; (j) Q526M/K557G; y (k) K541F/A561F.

27. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-15, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo, pero que no está conservado en seroalbúmina de pollo.

28. El polipéptido quimérico del punto 27, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos que están conservados entre proteínas seroalbúmina de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo, pero que no están conservados en SAH de pollo.

29. El polipéptido quimérico del punto 15, en el que dicha al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH está en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa (SEQ ID NO: 2): resto 383, resto 389, resto 391, resto 410, resto 417, resto 425, resto 442, resto 465, resto 467, resto 468, resto 486, resto 499, resto 502, resto 520, resto 532, resto 536, resto 543 y resto 571.

30. El polipéptido quimérico del punto 29, en el que dicha al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH está en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 383, resto 391, resto 434, resto 442, resto 445 y resto 450.

31. El polipéptido quimérico del punto 30, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH se selecciona del grupo que consiste en: V381N, E383A, E383G, E383I, E383L, E383V, N391A, N391G, N391I, N391L, N391V, G434C, G434S, G434T, E442K, E442R, R445F, R445W, R445Y, E450D y E450E.

32. El polipéptido quimérico del punto 29, en el que dicha al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH está en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 417, resto 442, resto 499 y resto 502.

33. El polipéptido quimérico del punto 27, en el que dicha al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH está en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 380, resto 381, resto 384, resto 387, resto 396, resto 401, resto 404, resto 405, resto 406, resto 409, resto 419, resto 421, resto 422, resto 424, resto 428, resto 430, resto 431, resto 433, resto 441, resto 457, resto 458, resto 463, resto 464, resto 466, resto 469, resto 470, resto 474, resto 475, resto 480, resto 481, resto 489, resto 491, resto 495, resto 500, resto 508, resto 510, resto 515, resto 516, resto 524, resto 525, resto 526, resto 528, resto 531, resto 535, resto 539, resto 544, resto 547 y resto 576.

34. El polipéptido quimérico del punto 33, en el que dicha al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH está en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 381, resto 401, resto 424, resto 457, resto 463, resto 495, resto 508, resto 515, resto 516, resto 524, resto 525, resto 526, resto 531, resto 535 y resto 539.

35. El polipéptido quimérico del punto 34, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH se selecciona del grupo que consiste en: V381N, V381Q, Y401D, Y401E, V424N, V424Q, L457F, L457W, L457Y, L463N, L463Q, E495D, T508K, T508R, T508S, T515C, T515H, T515N, T515P, T515Q, T515S, L516F, L516S, L516T, L516W, L516Y, K524A, K524G, K524I, K524L, K524V, K525A, K525G, K525I, K525L, K525V, Q526C, Q526M, Q526S, Q526T, Q526Y, E531A, E531G, E531I, E531L, E531V, H535D, H535E, H535P, A539I y A539L, A539V.

36. El polipéptido quimérico del punto 29, en el que todas estas sustituciones de aminoácido se seleccionan entre los miembros del grupo que consiste en: resto 383, resto 389, resto 391, resto 410, resto 417, resto 425, resto 442, resto 465, resto 467, resto 468, resto 486, resto 499, resto 502, resto 520, resto 532, resto 536, resto 543 y resto 571.

37. El polipéptido quimérico del punto 33, en el que todas estas sustituciones de aminoácido se seleccionan entre los miembros del grupo que consiste en: resto 380, resto 381, resto 384, resto 387, resto 396, resto 401, resto 404, resto 405, resto 406, resto 409, resto 419, resto 421, resto 422, resto 424, resto 428, resto 430, resto 431, resto 433, resto 441, resto 457, resto 458, resto 463, resto 464, resto 466, resto 469, resto 470, resto 474, resto 475, resto 480, resto 481, resto 489, resto 491, resto 495, resto 500, resto 508, resto 510, resto 515, resto 516, resto 524, resto 525, resto 526, resto 528, resto 531, resto 535, resto 539, resto 544, resto 547 y resto 576.
38. El polipéptido quimérico del punto 29 o 33, en el que todas estas sustituciones de aminoácido se seleccionan entre los miembros del grupo que consiste en: resto 380, resto 381, resto 384, resto 383, resto 387, resto 389, resto 391, resto 396, resto 401, resto 404, resto 405, resto 406, resto 409, resto 410, resto 417, resto 419, resto 421, resto 422, resto 424, resto 425, resto 428, resto 430, resto 431, resto 433, resto 441, resto 442, resto 457, resto 458, resto 463, resto 464, resto 465, resto 466, resto 467, resto 468, resto 469, resto 470, resto 474, resto 475, resto 480, resto 481, resto 486, resto 489, resto 491, resto 495, resto 499, resto 500, resto 502, resto 508, resto 510, resto 515, resto 516, resto 520, resto 524, resto 525, resto 526, resto 528, resto 531, resto 532, resto 535, resto 536, resto 539, resto 543, resto 544, resto 547, resto 571 y resto 576.
39. El polipéptido quimérico del punto 38, en el que todas estas sustituciones de aminoácido se seleccionan entre los miembros del grupo que consiste en: resto 381, resto 383, resto 391, resto 401, resto 424, resto 442, resto 463, resto 495, resto 506, resto 508, resto 515, resto 516, resto 524, resto 525, resto 526, resto 531, resto 535 y resto 539.
40. El polipéptido quimérico del punto 39, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH se selecciona del grupo que consiste en: V381N, V381Q, E383A, E383G, E383I, E383L, E383V, N391A, N391G, N391I, N391L, N391V, Y401D, Y401E, V424A, V424G, V424I, V424L, V424N, V424Q, E442K, E442R, L463N, L463Q, E495D, T506F, T506W, T506Y, T508K, T508R, T508S, T515C, T515H, T515N, T515P, T515Q, T515S, L516S, L516T, L516W, L516Y, K524A, K524G, K524I, K524L, K524V, K525A, K525G, K525I, K525L, K525V, Q526C, Q526M, Q526S, Q526T, Q526Y, E531A, E531G, E531I, E531L, E531V, H535D, H535E, H535P, A539I, A539L y A539V.
41. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-40, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto accesible en la superficie.
42. El polipéptido quimérico del punto 41, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos accesibles en la superficie.
43. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-12, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está tanto accesible en la superficie como conservado entre múltiples especies.
44. El polipéptido quimérico del punto 43, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos que están tanto accesibles en la superficie como conservados entre múltiple especies.
45. El polipéptido quimérico del punto 43 o 44, en el que dicha al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH está en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 383, resto 389, resto 391, resto 410, resto 417, resto 425, resto 442, resto 465, resto 467, resto 468, resto 486, resto 499, resto 502, resto 520, resto 532, resto 536, resto 543 y resto 571.
46. El polipéptido quimérico del punto 45, en el que dicha al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH está en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 383, resto 391 y resto 442.
47. El polipéptido quimérico del punto 45, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH se selecciona del grupo que consiste en: E383A, E383G, E383I, E383L, E383V, N391A, N391G, N391I, N391L, N391V y E442K, E442R.
48. El polipéptido quimérico del punto 45, en el que dicha al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH está en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 417, resto 442, resto 499 y resto 502.
49. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-48, en el que el dominio III de SAH comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.
50. El polipéptido quimérico del punto 49, en el que el dominio III de SAH comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.
51. El polipéptido quimérico del punto 49, en el que el dominio III de SAH comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.
52. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-48, en el que la parte de SAH comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.
53. El polipéptido quimérico del punto 52, en el que la parte de SAH comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.
54. El polipéptido quimérico del punto 52, en el que la parte de SAH comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.
55. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-54, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en el bucle 2 del dominio III de SAH.
56. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-22, 27-29, 32, 33, 36-38, 41-45 o 48-55, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH están en el bucle 2 del dominio III de SAH.
57. El polipéptido quimérico del punto 55 o 56, que comprende de una a cinco sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH, en el que dichas de una a cinco sustituciones de aminoácido están en el bucle 2 del dominio III de SAH.

58. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-55, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en el bucle 3 del dominio III de SAH.
59. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-22, 27-33, 36-54 o 58, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH están en el bucle 3 del dominio III de SAH.
- 5 60. El polipéptido quimérico del punto 58 o 59, que comprende de una a cinco sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH, en el que dichas de una a cinco sustituciones de aminoácido están en el bucle 3 del dominio III de SAH.
61. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-55 o 58, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en el bucle 6 del dominio III de SAH.
- 10 62. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-22, 27-29, 32, 33-45, 48-54 o 61, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH están en el bucle 6 del dominio III de SAH.
63. El polipéptido quimérico del punto 61 o 62, que comprende de una a dieciocho sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH, en el que dichas de una a dieciocho sustituciones de aminoácido están en el bucle 6 del dominio III de SAH.
- 15 64. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-55, 58 o 61, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en la hélice 7 del dominio III de SAH.
65. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-22, 27-29, 32, 33-45, 48-54 o 64, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH están en la hélice 7 del dominio III de SAH.
- 20 66. El polipéptido quimérico del punto 67 o 68, que comprende de una a tres sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH, en el que dichas de una a seis sustituciones de aminoácido están en la hélice 7 del dominio III de SAH.
67. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-55, 58, 61, 64, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en el bucle 7 del dominio III de SAH.
- 25 68. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-22, 27-29, 32, 33-45, 48-54 o 67, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH están en el bucle 7 del dominio III de SAH.
69. El polipéptido quimérico del punto 67 o 68, que comprende de una a tres sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH, en el que dichas de una a tres sustituciones de aminoácido están en el bucle 7 del dominio III de SAH.
- 30 70. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-55, 58, 61, 64 o 67, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en la hélice 8 del dominio III de SAH.
71. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-22, 27-28, 37, 38, 41-44, 49-54 o 70, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH están en la hélice 8 del dominio III de SAH.
- 35 72. El polipéptido quimérico del punto 70 o 71, que comprende de una a cinco sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH, en el que dichas de una a dieciocho sustituciones de aminoácido están en la hélice 8 del dominio III de SAH.
73. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-55, 58, 61, 64, 67 o 70, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en el bucle 8 del dominio III de SAH.
- 40 74. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-22, 27-28, 37, 38, 41-44, 49-54 o 73, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH están en el bucle 8 del dominio III de SAH.
75. El polipéptido quimérico del punto 73 o 74, que comprende de una a cinco sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH, en el que dichas de una a cinco sustituciones de aminoácido están en el bucle 8 del dominio III de SAH.
- 45 76. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-55, 58, 61, 64, 67, 70 o 73, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en el bucle 9 del dominio III de SAH.
77. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-22, 27-28, 41-44, 49-54 o 76, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH están en el bucle 9 del dominio III de SAH.
78. El polipéptido quimérico del punto 76 o 77, que comprende de una a cuatro sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH, en el que dichas de una a cuatro sustituciones de aminoácido están en el bucle 9 del dominio III de SAH.
- 50 79. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-78, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un resto de aminoácido con una alanina.
80. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-79, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende una sustitución conservativa de aminoácido.
- 55 81. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-80, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido básico con otro aminoácido básico.
82. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-81, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido.
83. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-83, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido neutro con otro aminoácido neutro.
- 60 84. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-83, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: lisina, arginina e histidina.
85. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-84, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: aspartato y glutamato.
- 65

86. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-85, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: asparagina, glutamina, serina, treonina y tirosina.
- 5 87. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-86, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: alanina, valina, isoleucina, leucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, cisteína y glicina.
88. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-87, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: fenilalanina, triptófano y tirosina.
- 10 89. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-88, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: cisteína, serina y treonina.
90. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-89, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato.
- 15 91. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-90, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: glicina, serina, treonina, alanina, valina, leucina e isoleucina.
92. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-91, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende una sustitución no conservativa.
- 20 93. El polipéptido quimérico del punto 79, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden un remplazo de un resto de aminoácido con una alanina.
94. El polipéptido quimérico del punto 80, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, sustituciones conservativas de aminoácido.
- 25 95. El polipéptido quimérico del punto 81, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido básico con otro aminoácido básico.
96. El polipéptido quimérico del punto 83, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido.
- 30 97. El polipéptido quimérico del punto 83, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido neutro con otro aminoácido neutro.
98. El polipéptido quimérico del punto 84, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: lisina, arginina e histidina.
- 35 99. El polipéptido quimérico del punto 85, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: aspartato y glutamato.
100. El polipéptido quimérico del punto 86, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: asparagina, glutamina, serina, treonina y tirosina.
- 40 101. El polipéptido quimérico del punto 87, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: alanina, valina, isoleucina, leucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, cisteína y glicina.
102. El polipéptido quimérico del punto 88, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo:
- 45 fenilalanina, triptófano y tirosina.
103. El polipéptido quimérico del punto 89, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: cisteína, serina y treonina.
- 50 104. El polipéptido quimérico del punto 90, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato.
105. El polipéptido quimérico del punto 91, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: glicina, serina, treonina, alanina, valina, leucina e isoleucina.
- 55 106. El polipéptido quimérico del punto 92, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, sustituciones no conservativas.
107. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-106, en el que la proteína heteróloga comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 60 108. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-107, en el que la proteína heteróloga comprende una proteína terapéutica.
109. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-108, que comprende además una región constante de una inmunoglobulina IgG.
110. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-109, en el que la parte de SAH se conjuga químicamente a la proteína heteróloga.
- 65

111. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-109, en el que la parte de SAH se conjuga de forma recombinante a la proteína heteróloga.
112. El polipéptido quimérico del punto 111, en el que el polipéptido quimérico se produce usando un vector recombinante que codifica tanto la parte de SAH como la proteína heteróloga.
- 5 113. El polipéptido quimérico del punto 111 o 112, en el que el polipéptido quimérico se produce en una célula procariota o eucariota.
114. El polipéptido quimérico del punto 113, en el que la célula eucariota se selecciona de una célula de levadura, una célula de ave, una célula de insecto o una célula de mamífero.
115. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 110-114, en el que la parte de SAH y la proteína heteróloga se conjugan directamente entre sí.
- 10 116. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 110-114, en el que la parte de SAH y la proteína heteróloga se conjugan mediante un conector.
117. El polipéptido quimérico del punto 116, en el que el conector comprende una o más repeticiones Gly-Gly-Gly-Gly-Ser.
- 15 118. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-117, en el que la parte de SAH se conjuga con el aminoácido del extremo N de la proteína heteróloga.
119. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-117, en el que la parte de SAH se conjuga con el aminoácido del extremo C de la proteína heteróloga.
- 20 120. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-117, en el que la parte de SAH se conjuga con un aminoácido interno de la proteína heteróloga.
121. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-120, en el que la parte de SAH comprende además al menos una parte del dominio I de SAH; o al menos una parte del dominio II de SAH; o al menos una parte del dominio I de SAH y al menos una parte del dominio II de SAH.
- 25 122. El polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-121, en el que dicho polipéptido quimérico está sustancialmente purificado.
123. Una composición que comprende el polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-122 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
124. La composición del punto 123, en la que dicha composición es una composición estéril.
- 30 125. La composición del punto 123 o 124, en la que dicha composición es apirógena.
126. Un método de tratamiento de un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a dicho sujeto un polipéptido quimérico de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-122 o una composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 123-125.
- 35 127. Un método de aumento de la semivida en suero de una proteína en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a dicho sujeto un polipéptido quimérico de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-122.
128. El método del punto 126 o 127, en el que la administración a dicho sujeto comprende administrar dicho polipéptido quimérico de forma sistémica.
- 40 129. El método del punto 126 o 127, en el que la administración a dicho sujeto comprende administrar dicho polipéptido quimérico por una vía seleccionada del grupo que consiste en: intradérmica, transdérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intravascular, intrapericárdica, subcutánea, pulmonar, intranasal, intraocular, epidural, tópica y oral.
130. El método del punto 126 o 127, en el que la administración a dicho sujeto comprende administrar dicho polipéptido quimérico por vía intravenosa.
- 45 131. Una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido quimérico de cualquiera de los puntos 1-121.
132. Un polipéptido variante de seroalbúmina humana (SAH), que comprende el dominio III de SAH o un fragmento de unión al receptor Fc neonatal (FcRn) del mismo, en el que dicho polipéptido variante puede unirse a un FcRn y en el que dicho dominio III de SAH comprende de una a dieciocho sustituciones de aminoácido para aumentar la afinidad de dicho polipéptido variante por FcRn respecto a un polipéptido de SAH de control que carece de dichas sustituciones.
- 50 133. El polipéptido variante del punto 132, en el que el polipéptido variante se une a FcRn con una mayor afinidad que dicho polipéptido de control, y en el que dicha afinidad se mide a pH ácido.
134. El polipéptido variante del punto 132 o 133, en el que el pH ácido es entre 5,0 y 6,0.
135. El polipéptido variante del punto 134, en el que el pH ácido es $5,5 \pm 0,2$.
- 55 136. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132, en el que el polipéptido variante se une a FcRn con una mayor afinidad que dicho polipéptido de control a pH ácido, pero dicho polipéptido variante no se une a FcRn con mayor afinidad que dicho polipéptido de control a pH neutro.
137. El polipéptido variante del punto 136, en el que el pH neutro es entre 6,9 y 7,9.
138. El polipéptido variante del punto 137, en el que el pH neutro es $7,4 \pm 0,2$.
- 60 139. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132, en el que el polipéptido variante tiene una semivida en suero más larga que dicho polipéptido de SAH de control.
140. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-139, en el que el dominio III de SAH comprende de una a diez sustituciones de aminoácido.
141. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-140, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está conservado entre múltiples especies.
- 65 142. El polipéptido variante del punto 141, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos que están conservados entre múltiples especies.

143. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-140, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo.
- 5 144. El polipéptido variante del punto 143, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos que están conservados entre proteínas seroalbúmina de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo.
145. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-143, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH se selecciona de las enumeradas en la tabla 5.
- 10 146. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-143, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 381, resto 383, resto 391, resto 401, resto 402, resto 407, resto 411, resto 413, resto 414, resto 415, resto 416, resto 424, resto 426, resto 434, resto 442, resto 445, resto 447, resto 450, resto 454, resto 455, resto 456, resto 457, resto 459, resto 463, resto 495, resto 506, resto 508, resto 509, resto 511, resto 512, resto 515, resto 516, resto 517, resto 519, resto 521, resto 523, resto 524, resto 525, resto 526, resto 527, resto 531, resto 535, resto 538, resto 539, resto 541, resto 557, resto 561, resto 566, resto 569.
- 15 147. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-143, en el que el polipéptido variante comprende sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH en las posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa, seleccionadas del grupo que consiste en: (a) restos 383 y 413; (b) restos 401 y 523; (c) restos 407 y 447; (d) restos 407 y 447 y 539; (e) restos 407 y 509; (f) restos 407 y 526; (g) restos 411 y 535; (h) restos 414 y 456; (i) restos 415 y 569; (j) restos 426 y 526; (k) restos 442 y 450 y 459; (l) restos 463 y 508; (m) restos 508 y 519 y 525; (n) restos 509 y 527; (o) restos 523 y 538; (p) restos 526 y 557; y (q) restos 541 y 561.
- 20 148. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-143 o 146, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH se selecciona del grupo que consiste en: V381N, V381Q, E383A, E383G, E383I, E383L, E383V, N391A, N391G, N391I, N391L, N391V, Y401D, Y401E, K402A, K402G, K402I, K402L, K402V, L407F, L407N, L407Q, L407W, L407Y, Y411Q, Y411N, K413C, K413S, K413T, K414S, K414T, V415C, V415S, V415T, Q416H, Q416P, V424A, V424G, V424I, V424L, V424N, V424Q, V426D, V426E, V426H, V426P, G434C, G434S, G434T, E442K, E442R, R445F, R445W, R445Y, P447S, P447T, E450D, E450E, S454C, S454M, S454T, V455N, V455Q, V456N, V456Q, L457F, L457W, L457Y, Q459K, Q459R, L463N, L463Q, E495D, T506F, T506W, T506Y, T508K, T508R, T508S, F509C, F509I, F509L, F509M, F509V, F509W, F509Y, A511F, A511W, A511Y, D512F, D512W, D512Y, T515C, T515H, T515N, T515P, T515Q, T515S, L516F, L516S, L516T, L516W, L516Y, S517C, S517M, S517T, S517W, S517Y, K519A, K519G, K519I, K519L, K519V, R521F, R521W, R521Y, I523A, I523D, I523E, I523F, I523G, I523I, I523K, I523L, I523N, I523Q, I523R, I523V, I523W, I523Y, K524A, K524G, K524I, K524L, K524V, K525A, K525G, K525I, K525L, K525V, Q526C, Q526M, Q526S, Q526T, Q526Y, T527F, T527W, T527Y, E531A, E531G, E531I, E531L, E531V, H535D, H535E, H535P, K538F, K538W, K538Y, A539I, A539L, A539V, K541F, K541W, K541Y, K557A, K557G, K557I, K557L, K557V, A561F, A561W, A561Y, T566F, T566W, T566Y, A569H y A569P.
- 25 30 35 40 45 149. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-143, 146 o 148, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH se selecciona del grupo que consiste en: V381N, E383G, N391V, Y401E, K402A, L407N, L407Y, Y411Q, K414S, K413S, V415T, V415C, Q416P, V424I, V424Q, V426E, V426H, G434C, E442K, R445W, P447S, E450D, S454C, V455N, V456N, L457F, Q459R, L463N, E495D, T506Y, T508R, T508S, F509M, F509W, A511F, D512Y, T515P, T515Q, T515S, L516T, L516W, S517C, S517W, K519I, R521W, I523D, I523E, I523Q, I523K, I523G, I523R, I523Y, K524L, K524V, K525V, Q526T, Q526M, Q526Y, T527Y, E531I, H535N, H535P, K538Y, A539I, K541F, K557G, A561F, T566W y A569P.
- 50 150. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-143 o 146, en el que el polipéptido variante comprende una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH seleccionada del grupo que consiste en: V381N, E383G, N391V, Y401E, K402A, L409N, L407Y, Y411Q, K414S, K413S, V415T, V415C, Q416P, V424I, V424Q, V426E, V426H, G434C, E442K, R445W, P447S, E450D, S454C, V455N, V456N, L457F, Q459R, L463N, E495D, T506Y, T508R, T508S, F509I, F509M, F509W, A511F, D512Y, T515P, T515Q, T515S, L516T, L516W, S517C, S517W, K519I, R521W, I523D, I523E, I523Q, I523K, I523G, I523R, I523Y, K524L, K524V, K525V, Q526T, Q526M, Q526Y, T527Y, E531I, H535N, H535P, K538Y, A539I, K541F, K557G, A561F, T566W y A569P.
- 55 151. El polipéptido variante del punto 149, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH se selecciona del grupo que consiste en: L407N, L407Y, V415T, V424I, V424Q, V426E, V426H, P447S, V455N, V456N, L463N, E495D, T506Y, T508R, F509M, F509W, A511F, D512Y, T515Q, L516T, L516W, S517W, R521W, I523D, I523E, I523G, I523K, I523R, K524L, Q526M, T527Y, H535P y K557G.
- 60 152. El polipéptido variante del punto 150, en el que el polipéptido variante comprende una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH seleccionada del grupo que consiste en: L407N, L407Y, V415T, V424I, V424Q, V426E, V426H, P447S, V455N, V456N, L463N, E495D, T506Y, T508R, F509M, F509W, A511F, D512Y, T515Q, L516T, L516W, S517W, R521W, I523D, I523E, I523G, I523K, I523R, K524L, Q526M, T527Y, H535P y K557G.
- 65 153. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-143 o 146, en el que el polipéptido variante comprende sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH seleccionadas del grupo que consiste en: (a) E383G/K413S; (b) Y401E/I523G; (c) L407N/P447S; (d) L407N/P447S/A539I; (e) L407N/F509M; (f) L407Y/Q526T; (g) Y411Q/H535N; (h) K414S/V456N; (i) V415T/A569P; (j) V426H/Q526Y; (k)

E442K/E450D/Q459R; (l) L463N/T508R; (m) T508R/K519I/K525V; (n) F509I/T527Y; (o) I523Q/K538Y; (p) Q526M/K557G; y (q) K541F/A561F.

5 154. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-143 o 146, en el que el polipéptido variante comprende sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH seleccionadas del grupo que consiste en: (a) L407N/P447S; (b) L407N/P447S/A539I; (c) L407N/F509M; (d) Y411Q/H535N; (e) K414S/V456N; (f) V426H/Q526Y; (g) L463N/T508R; (h) F509I/T527Y; (i) I523Q/K538Y; (j) Q526M/K557G; y (k) K541F/A561F.

10 155. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-143, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo, pero que no está conservado en seroalbúmina de pollo.

156. El polipéptido variante del punto 155, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos que están conservados entre proteínas seroalbúmina de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo, pero que no están conservados en SAH de pollo.

15 157. El polipéptido variante del punto 143, en el que dicha al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH está en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa (SEQ ID NO: 2): resto 383, resto 389, resto 391, resto 410, resto 417, resto 425, resto 442, resto 465, resto 467, resto 468, resto 486, resto 499, resto 502, resto 520, resto 532, resto 536, resto 543 y resto 571.

20 158. El polipéptido variante del punto 157, en el que dicha al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH está en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 383, resto 391, resto 434, resto 442, resto 445 y resto 450.

25 159. El polipéptido variante del punto 158, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH se selecciona del grupo que consiste en: V381N, E383A, E383G, E383I, E383L, E383V, N391A, N391G, N391I, N391L, N391V, G434C, G434S, G434T, E442K, E442R, R445F, R445W, R445Y, E450D y E450E.

30 160. El polipéptido variante del punto 157, en el que dicha al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH está en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 417, resto 442, resto 499 y resto 502.

35 161. El polipéptido variante del punto 155, en el que dicha al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH está en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 380, resto 381, resto 384, resto 387, resto 396, resto 401, resto 404, resto 405, resto 406, resto 409, resto 419, resto 421, resto 422, resto 424, resto 428, resto 430, resto 431, resto 433, resto 441, resto 457, resto 458, resto 463, resto 464, resto 466, resto 469, resto 470, resto 474, resto 475, resto 480, resto 481, resto 489, resto 491, resto 495, resto 500, resto 508, resto 510, resto 515, resto 516, resto 524, resto 525, resto 526, resto 528, resto 531, resto 535, resto 539, resto 544, resto 547 y resto 576.

40 162. El polipéptido variante del punto 161, en el que dicha al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH está en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 381, resto 401, resto 424, resto 457, resto 463, resto 495, resto 508, resto 515, resto 516, resto 524, resto 525, resto 526, resto 531, resto 535 y resto 539.

45 163. El polipéptido variante del punto 162, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH se selecciona del grupo que consiste en: V381N, V381Q, Y401D, Y401E, V424N, V424Q, L457F, L457W, L457Y, L463N, L463Q, E495D, T508K, T508R, T508S, T515C, T515H, T515N, T515P, T515Q, T515S, L516F, L516S, L516T, L516W, L516Y, K524A, K524G, K524I, K524L, K524V, K525A, K525G, K525I, K525L, K525V, Q526C, Q526M, Q526S, Q526T, Q526Y, E531A, E531G, E531I, E531L, E531V, H535D, H535E, H535P, A539I y A539L, A539V.

50 164. El polipéptido variante del punto 157, en el que todas estas sustituciones de aminoácido se seleccionan entre los miembros del grupo que consiste en: resto 383, resto 389, resto 391, resto 410, resto 417, resto 425, resto 442, resto 465, resto 467, resto 468, resto 486, resto 499, resto 502, resto 520, resto 532, resto 536, resto 543 y resto 571.

55 165. El polipéptido variante del punto 161, en el que todas estas sustituciones de aminoácido se seleccionan entre los miembros del grupo que consiste en: resto 380, resto 381, resto 384, resto 387, resto 396, resto 401, resto 404, resto 405, resto 406, resto 409, resto 419, resto 421, resto 422, resto 424, resto 428, resto 430, resto 431, resto 433, resto 441, resto 457, resto 458, resto 463, resto 464, resto 466, resto 469, resto 470, resto 474, resto 475, resto 480, resto 481, resto 489, resto 491, resto 495, resto 500, resto 508, resto 510, resto 515, resto 516, resto 524, resto 525, resto 526, resto 528, resto 531, resto 535, resto 539, resto 544, resto 547 y resto 576.

60 166. El polipéptido variante del punto 157 o 161, en el que todas estas sustituciones de aminoácido se seleccionan entre los miembros del grupo que consiste en: resto 380, resto 381, resto 384, resto 383, resto 387, resto 389, resto 391, resto 396, resto 401, resto 404, resto 405, resto 406, resto 409, resto 410, resto 417, resto 419, resto 421, resto 422, resto 424, resto 425, resto 428, resto 430, resto 431, resto 433, resto 441, resto 442, resto 457, resto 458, resto 463, resto 464, resto 465, resto 466, resto 467, resto 468, resto 469, resto 470, resto 474, resto 475, resto 480, resto 481, resto 486, resto 489, resto 491, resto 495, resto 499, resto 500, resto 502, resto 508, resto 510, resto 515, resto 516, resto 520, resto 524, resto 525, resto 526, resto 528, resto 531, resto 532, resto 535, resto 536, resto 539, resto 543, resto 544, resto 547, resto 571 y resto 576.

65 167. El polipéptido variante del punto 166, en el que todas estas sustituciones de aminoácido se seleccionan entre los miembros del grupo que consiste en: resto 381, resto 383, resto 391, resto 401, resto 424, resto 442,

resto 463, resto 495, resto 508, resto 515, resto 516, resto 524, resto 525, resto 526, resto 531, resto 535 y resto 539.

5 168. El polipéptido variante del punto 167, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH se selecciona del grupo que consiste en: V381N, V381Q, E383A, E383G, E383I, E383L, E383V, N391A, N391G, N391I, N391L, N391V, Y401D, Y401E, V424A, V424G, V424I, V424L, V424N, V424Q, E442K, E442R, L463N, L463Q, E495D, T506F, T506W, T506Y, T508K, T508R, T508S, T515C, T515H, T515N, T515P, T515Q, T515S, L516S, L516T, L516W, L516Y, K524A, K524G, K524I, K524L, K524V, K525A, K525G, K525I, K525L, K525V, Q526C, Q526M, Q526S, Q526T, Q526Y, E531A, E531G, E531I, E531L, E531V, H535D, H535E, H535P, A539I, A539L y A539V.

10 169. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-166, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto accesible en la superficie.

170. El polipéptido variante del punto 169, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos accesibles en la superficie.

15 171. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-166, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está tanto accesible en la superficie como conservado entre múltiples especies.

172. El polipéptido variante del punto 171, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos que están tanto accesibles en la superficie como conservados entre múltiples especies.

20 173. El polipéptido variante del punto 171 o 172, en el que dicha al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH está en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 383, resto 389, resto 391, resto 410, resto 417, resto 425, resto 442, resto 465, resto 467, resto 468, resto 486, resto 499, resto 502, resto 520, resto 532, resto 536, resto 543 y resto 571.

25 174. El polipéptido variante del punto 173, en el que dicha al menos una sustitución de aminoácido en el dominio III de SAH está en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 383, resto 391 y resto 442.

175. El polipéptido variante del punto 174, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH se selecciona del grupo que consiste en: E383A, E383G, E383I, E383L, E383V, N391A, N391G, N391I, N391L, N391V y E442K, E442R.

30 176. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-172, en el que el dominio III de SAH comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

177. El polipéptido variante del punto 176, en el que el dominio III de SAH comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

35 178. El polipéptido variante del punto 177, en el que el dominio III de SAH comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

179. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-178, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en el bucle 2 del dominio III de SAH.

180. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-150, 155-157, 161, 164-166, 169-173, 176-179, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH están en el bucle 2 del dominio III de SAH.

40 181. El polipéptido variante del punto 179 o 180, que comprende de una a cinco sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH, en el que dichas de una a cinco sustituciones de aminoácido están en el bucle 2 del dominio III de SAH.

182. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-179, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en el bucle 3 del dominio III de SAH.

45 183. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-150, 155-161, 164-166-178 o 182, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH están en el bucle 3 del dominio III de SAH.

184. El polipéptido variante de los puntos 182 o 183, que comprende de una a cinco sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH, en el que dichas de una a cinco sustituciones de aminoácido están en el bucle 3 del dominio III de SAH.

50 185. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-173 o 182, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en el bucle 6 del dominio III de SAH.

186. El polipéptido variante del punto 132-150, 155-157, 160-173, 176-178 o 185, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH están en el bucle 6 del dominio III de SAH.

55 187. El polipéptido variante del punto 185 o 186, que comprende de una a cinco sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH, en el que dichas de una a cinco sustituciones de aminoácido están en el bucle 6 del dominio III de SAH.

188. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-173, 182 o 185, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en la hélice 7 del dominio III de SAH.

60 189. El polipéptido variante del punto 132-150, 155-157, 160-173, 176-178 o 188, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH están en la hélice 7 del dominio III de SAH.

190. El polipéptido variante del punto 188 o 192, que comprende de una a tres sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH, en el que dichas de una a seis sustituciones de aminoácido están en la hélice 7 del dominio III de SAH.

65 191. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-173, 182, 185 o 188, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en el bucle 7 del dominio III de SAH.

192. El polipéptido variante del punto 132-150, 155-157, 160-173, 176-178 o 191, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH están en el bucle 7 del dominio III de SAH.

193. El polipéptido variante del punto 191 o 192, que comprende de una a tres sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH, en el que dichas de una a tres sustituciones de aminoácido están en el bucle 7 del dominio III de SAH.
- 5 194. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-173, 182, 185, 188 o 191, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en la hélice 8 del dominio III de SAH.
195. El polipéptido variante del punto 132-150, 155-157, 165-166, 169-173, 176-178 o 194, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH están en la hélice 8 del dominio III de SAH.
- 10 196. El polipéptido variante del punto 194 o 195, que comprende de una a cinco sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH, en el que dichas de una a dieciocho sustituciones de aminoácido están en la hélice 8 del dominio III de SAH.
197. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-173, 182, 185, 188, 191 o 194, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en el bucle 8 del dominio III de SAH.
- 15 198. El polipéptido variante del punto 132-150, 155-157, 165-166, 169-173, 176-178 o 197, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH están en el bucle 8 del dominio III de SAH.
199. El polipéptido variante del punto 197 o 198, que comprende de una a cinco sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH, en el que dichas de una a cinco sustituciones de aminoácido están en el bucle 8 del dominio III de SAH.
- 20 200. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-173, 182, 185 o 197, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en el bucle 9 del dominio III de SAH.
201. El polipéptido variante del punto 132-150, 155, 156, 169-172, 176-178 o 200, en el que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH están en el bucle 9 del dominio III de SAH.
202. El polipéptido variante del punto 200 o 201, que comprende de una a cuatro sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH, en el que dichas de una a cuatro sustituciones de aminoácido están en el bucle 9 del dominio III de SAH.
- 25 203. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-202, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un resto de aminoácido con una alanina.
204. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-203, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende una sustitución conservativa de aminoácido.
- 30 205. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-204, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido básico con otro aminoácido básico.
206. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-205, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido.
207. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-206, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido neutro con otro aminoácido neutro.
- 35 208. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-207, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: lisina, arginina e histidina.
209. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-208, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: aspartato y glutamato.
- 40 210. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-209, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: asparagina, glutamina, serina, treonina y tirosina.
- 45 211. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-210, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: alanina, valina, isoleucina, leucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, cisteína y glicina.
212. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-211, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: fenilalanina, triptófano y tirosina.
- 50 213. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-212, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: cisteína, serina y treonina.
214. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-213, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato.
- 55 215. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-214, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende un remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: glicina, serina, treonina, alanina, valina, leucina e isoleucina.
216. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-215, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido comprende una sustitución no conservativa.
- 60 217. El polipéptido variante del punto 203, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden remplazo de un resto de aminoácido con una alanina.
218. El polipéptido variante del punto 204, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, sustituciones conservativas de aminoácido.
- 65 219. El polipéptido variante del punto 205, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido básico con otro aminoácido básico.

220. El polipéptido variante del punto 206, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido.
221. El polipéptido variante del punto 207, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido neutro con otro aminoácido neutro.
- 5 222. El polipéptido variante del punto 208, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: lisina, arginina e histidina.
223. El polipéptido variante del punto 209, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo:
- 10 aspartato y glutamato.
224. El polipéptido variante del punto 210, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: asparagina, glutamina, serina, treonina y tirosina.
225. El polipéptido variante del punto 211, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo:
- 15 alanina, valina, isoleucina, leucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, cisteína y glicina.
226. El polipéptido variante del punto 212, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: fenilalanina, triptófano y tirosina.
- 20 227. El polipéptido variante del punto 213, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: cisteína, serina y treonina.
228. El polipéptido variante del punto 214, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo:
- 25 asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato.
229. El polipéptido variante del punto 215, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, el remplazo de un aminoácido con otro dentro del siguiente grupo: glicina, serina, treonina, alanina, valina, leucina e isoleucina.
230. El polipéptido variante del punto 216, en el que todas estas sustituciones de aminoácido comprenden, independientemente en cada posición, sustituciones no conservativas.
- 30 231. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-230, en el que la parte de SAH comprende además al menos una parte del dominio I de SAH; o al menos una parte del dominio II de SAH; o al menos una parte del dominio I de SAH y al menos una parte del dominio II de SAH.
232. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-231, en el que dicho polipéptido variante está sustancialmente purificado.
- 35 233. El polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-232, en el que dicho polipéptido variante comprende además un sitio de unión para un epítipo en una diana.
234. El polipéptido variante del punto 233, en el que el sitio de unión antagoniza dicha diana.
235. El polipéptido variante del punto 233, en el que el sitio de unión agoniza dicha diana.
- 40 236. Una composición que comprende el polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-235 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
237. La composición del punto 236, en la que dicha composición es una composición estéril.
238. La composición del punto 236 o 237, en la que dicha composición es apirógena.
239. Un método de aumento de la semivida en suero de una proteína, que comprende conjugar a dicha proteína
- 45 un polipéptido variante de acuerdo con cualquiera de los puntos 132-235.
240. Un método de tratamiento de un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a dicho sujeto un polipéptido variante de acuerdo con cualquiera de los puntos 233-235.
241. Una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido variante de cualquiera de los puntos 132-231.
- 50 242. Una construcción de ácido nucleico, que comprende (a) una secuencia de nucleótidos que codifica una parte de seroalbúmina humana (SAH), cuya parte de SAH comprende el dominio III de SAH, o un fragmento de unión a FcRn del mismo, cuyo dominio III de SAH comprende de una a dieciocho sustituciones de aminoácido, unida de forma funcional a (b) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga, en la que la construcción de ácido nucleico codifica un polipéptido quimérico que retiene una actividad funcional de la
- 55 proteína heteróloga y puede unirse a un FcRn, y en la que dicho polipéptido quimérico tiene una semivida en suero aumentada y/o afinidad por FcRn aumentada respecto a un polipéptido quimérico de control en que la parte de SAH no incluye dichas sustituciones de aminoácido.
243. La construcción de ácido nucleico del punto 242, en la que el polipéptido quimérico se une a FcRn con una mayor afinidad que dicho polipéptido quimérico de control.
- 60 244. La construcción de ácido nucleico del punto 242 o 243, en la que el polipéptido quimérico se une a FcRn con una mayor afinidad que dicho polipéptido quimérico de control, y en la que dicha afinidad se mide a pH ácido.
245. La construcción de ácido nucleico del punto 244, en la que el pH ácido es entre 5,0 y 6,0.
246. La construcción de ácido nucleico del punto 245, en la que el pH ácido es $5,5 \pm 0,2$.
- 65 247. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-247, en la que el polipéptido quimérico se une a FcRn con una mayor afinidad que dicho polipéptido quimérico de control a pH ácido, pero dicho

polipéptido quimérico no se une a FcRn con mayor afinidad que dicho polipéptido quimérico de control a pH neutro.

248. La construcción de ácido nucleico del punto 247, en la que el pH neutro es entre 6,9 y 7,9.

249. La construcción de ácido nucleico del punto 248, en la que el pH neutro es $7,4 \pm 0,2$.

5 250. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242, en la que (i) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una parte de seroalbúmina humana (SAH), cuya parte de SAH comprende el dominio III de SAH, o un fragmento de unión a FcRn del mismo, cuyo dominio III de SAH comprende de una a diez sustituciones de aminoácido.

10 251. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-250, en la que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está conservado entre múltiples especies.

252. La construcción de ácido nucleico del punto 251, en la que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos que están conservados entre múltiples especies.

15 253. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-250, en la que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está conservado entre proteínas seroalbúmina de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo.

20 254. La construcción de ácido nucleico del punto 253, en la que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos que están conservados entre proteínas seroalbúmina de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo.

255. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-254, en la que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH se selecciona de las enumeradas en la tabla 5.

25 256. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-254, en la que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa: resto 381, resto 383, resto 391, resto 401, resto 402, resto 407, resto 411, resto 413, resto 414, resto 415, resto 416, resto 424, resto 426, resto 434, resto 442, resto 445, resto 447, resto 450, resto 454, resto 455, resto 456, resto 457, resto 459, resto 463, resto 495, resto 506, resto 508, resto 509, resto 511, resto 512, resto 515, resto 516, resto 517, resto 519, resto 521, resto 523, resto 524, resto 525, resto 526, resto 527, resto 531, resto 535, resto 538, resto 539, resto 541, resto 557, resto 561, resto 566, resto 569.

30 257. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-254, en la que la construcción de ácido nucleico comprende sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH en las posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa, seleccionadas del grupo que consiste en: (a) restos 383 y 413; (b) restos 401 y 523; (c) restos 407 y 447; (d) restos 407 y 447 y 539; (e) restos 407 y 509; (f) restos 407 y 526; (g) restos 411 y 535; (h) restos 414 y 456; (i) restos 415 y 569; (j) restos 426 y 526; (k) restos 442 y 450 y 459; (l) restos 463 y 508; (m) restos 508 y 519 y 525; (n) restos 509 y 527; (o) restos 523 y 538; (p) restos 526 y 557; y (q) restos 541 y 561.

40 258. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-254 o 256, en la que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH se selecciona del grupo que consiste en: V381N, V381Q, E383A, E383G, E383I, E383L, E383V, N391A, N391G, N391I, N391L, N391V, Y401D, Y401E, K402A, K402G, K402I, K402L, K402V, L407F, L407N, L407Q, L407W, L407Y, Y411Q, Y411N, K413C, K413S, K413T, K414S, K414T, V415C, V415S, V415T, Q416H, Q416P, V424A, V424G, V424I, V424L, V424N, V424Q, V426D, V426E, V426H, V426P, G434C, G434S, G434T, E442K, E442R, R445F, R445W, R445Y, P447S, P447T, E450D, E450E, S454C, S454M, S454T, V455N, V455Q, V456N, V456Q, L457F, L457W, L457Y, Q459K, Q459R, L463N, L463Q, E495D, T506F, T506W, T506Y, T508K, T508R, T508S, F509C, F509I, F509L, F509M, F509V, F509W, F509Y, A511F, A511W, A511Y, D512F, D512W, D512Y, T515C, T515H, T515N, T515P, T515Q, T515S, L516F, L516S, L516T, L516W, L516Y, S517C, S517F, S517M, S517T, S517W, S517Y, K519A, K519G, K519I, K519L, K519V, R521F, R521W, R521Y, I523A, I523D, I523E, I523F, I523G, I523I, I523K, I523L, I523N, I523Q, I523R, I523V, I523W, I523Y, K524A, K524G, K524I, K524L, K524V, K525A, K525G, K525I, K525L, K525V, Q526C, Q526M, Q526S, Q526T, Q526Y, T527F, T527W, T527Y, E531A, E531G, E531I, E531L, E531V, H535D, H535E, H535P, K538F, K538W, K538Y, A539I, A539L, A539V, K541F, K541W, K541Y, K557A, K557G, K557I, K557L, K557V, A561F, A561W, A561Y, T566F, T566W, T566Y, A569H y A569P.

50 259. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-254 o 256, en la que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH se selecciona del grupo que consiste en: V381N, E383G, N391V, Y401E, K402A, L407N, L407Y, Y411Q, K414S, K413S, V415T, V415C, Q416P, V424I, V424Q, V426E, V426H, G434C, E442K, R445W, P447S, E450D, S454C, V455N, V456N, L457F, Q459R, L463N, E495D, T506Y, T508R, T508S, F509I, F509M, F509W, A511F, D512Y, T515P, T515Q, T515S, L516T, L516W, S517C, S517W, K519I, R521W, I523D, I523E, I523Q, I523K, I523G, I523R, I523Y, K524L, K524V, K525V, Q526T, Q526M, Q526Y, T527Y, E531I, H535N, H535P, K538Y, A539I, K541F, K557G, A561F, T566W y A569P.

60 260. La construcción de ácido nucleico del punto 259, en la que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH se selecciona del grupo que consiste en: L407N, L407Y, V415T, V424I, V424Q, V426E, V426H, P447S, V455N, V456N, L463N, E495D, T506Y, T508R, F509M, F509W, A511F, D512Y, T515Q, L516T, L516W, S517W, R521W, I523D, I523E, I523G, I523K, I523R, K524L, Q526M, T527Y, H535P y K557G.

65 261. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-254 o 256, en la que el polipéptido quimérico comprende sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH seleccionadas del grupo que

consiste en: (a) E383G/K413S; (b) Y401E/I523G; (c) L407N/P447S; (d) L407N/P447S/A539I; (e) L407N/F509M; (f) L407Y/Q526T; (g) Y411Q/H535N; (h) K414S/V456N; (i) V415T/A569P; (j) V426H/Q526Y; (k) E442K/E450D/Q459R; (l) L463N/T508R; (m) T508R/K519I/K525V; (n) F509I/T527Y; (o) I523Q/K538Y; (p) Q526M/K557G; y (q) K541F/A561F.

5 262. La construcción de ácido nucleico del 261, en la que el polipéptido quimérico comprende sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH seleccionadas del grupo que consiste en: (a) L407N/P447S; (b) L407N/P447S/A539I; (c) L407N/F509M; (d) Y411Q/H535N; (e) K414S/V456N; (f) V426H/Q526Y; (g) L463N/T508R; (h) F509I/T527Y; (i) I523Q/K538Y; (j) Q526M/K557G; y (k) K541F/A561F.

10 263. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-254, en la que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto accesible en la superficie.

264. La construcción de ácido nucleico del punto 263, en la que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos accesibles en la superficie.

15 265. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-250, en la que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH es de un resto que está tanto accesible en la superficie como conservado entre múltiples especies.

266. La construcción de ácido nucleico del punto 265, en la que todas estas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH son de restos que están tanto accesibles en la superficie como conservados entre múltiple especies.

20 267. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-266, en la que (i) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio III de SAH al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

268. La construcción de ácido nucleico del punto 267, en la que (i) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio III de SAH al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

269. La construcción de ácido nucleico del punto 268, en la que (i) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio III de SAH al menos un 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

25 270. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-269, en la que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en el bucle 2 del dominio III de SAH.

271. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-270, en la que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en el bucle 3 del dominio III de SAH.

30 272. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-271, en la que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en el bucle 6 del dominio III de SAH.

273. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-272, en la que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en la hélice 7 del dominio III de SAH.

274. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-273, en la que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en el bucle 7 del dominio III de SAH.

35 275. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-274, en la que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en la hélice 8 del dominio III de SAH.

276. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-275, en la que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en el bucle 8 del dominio III de SAH.

40 277. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-276, en la que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH está en el bucle 9 del dominio III de SAH.

278. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-277, en la que (ii) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga, cuya proteína heteróloga comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

45 279. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-278, que comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica un conector.

280. La construcción de ácido nucleico del punto 279, en la que la secuencia de nucleótidos codifica un conector que comprende una o más repeticiones Gly-Gly-Gly-Ser.

50 281. La construcción de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 242-280, en la que la parte de SAH comprende además al menos una parte del dominio I de SAH; o al menos una parte del dominio II de SAH; o al menos una parte del dominio I de SAH y al menos una parte del dominio II de SAH.

55 282. Una colección que comprende una pluralidad de polipéptidos, en la que cada uno de dicha pluralidad de polipéptidos comprende el dominio III de SAH, o un fragmento de unión a FcRn del mismo, y en la que cada uno de dicha pluralidad de polipéptidos comprende independientemente al menos una sustitución de aminoácido de un resto en dicho dominio III de SAH que está conservado entre proteínas seroalbúmina de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo.

60 283. Una colección que comprende una pluralidad de polipéptidos, en la que cada uno de dicha pluralidad de polipéptidos comprende el dominio III de SAH, o un fragmento de unión a FcRn del mismo, y en la que cada uno de dicha pluralidad de polipéptidos comprende independientemente al menos una sustitución de aminoácido de un resto en dicho dominio III de SAH que está conservado entre proteínas seroalbúmina de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo y que no está conservado en seroalbúmina de pollo.

65 284. Una colección que comprende una pluralidad de polipéptidos, en la que cada uno de dicha pluralidad de polipéptidos comprende el dominio III de SAH, o un fragmento de unión a FcRn del mismo, y en la que cada uno de dicha pluralidad de polipéptidos comprende independientemente al menos una sustitución de aminoácido de un resto en dicho dominio III de SAH que es un resto accesible en la superficie.

285. La colección del punto 284, en la que dicho resto accesible en la superficie está en el bucle 2 del dominio III de SAH.

286. La colección del punto 284 o 285, en la que dicho resto accesible en la superficie está en el bucle 3 del dominio III de SAH.

5 287. La colección de cualquiera de los puntos 284-286, en la que dicho resto accesible en la superficie está en el bucle 6 del dominio III de SAH.

288. La colección de cualquiera de los puntos 284-273, en la que dicho resto accesible en la superficie está en el bucle 7 del dominio III de SAH.

10 289. La colección de cualquiera de los puntos 284-288, en la que dicho resto accesible en la superficie está en el bucle 8 del dominio III de SAH.

290. La colección de cualquiera de los puntos 284-289, en la que dicho resto accesible en la superficie está en el bucle 9 del dominio III de SAH.

15 291. Una colección que comprende una pluralidad de polipéptidos, en la que cada uno de dicha pluralidad de polipéptidos comprende el dominio III de SAH, o un fragmento de unión a FcRn del mismo, y en la que cada uno de dicha pluralidad de polipéptidos comprende independientemente al menos una sustitución de aminoácido de un resto en dicho dominio III de SAH que es (i) un resto accesible en la superficie y también (ii) está conservado entre proteínas seroalbúmina de ser humano, cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo.

20 292. Una colección que comprende una pluralidad de polipéptidos, en la que cada uno de dicha pluralidad de polipéptidos comprende el dominio III de SAH, o un fragmento de unión a FcRn del mismo, y en la que cada uno de dicha pluralidad de polipéptidos comprende independientemente al menos una sustitución de aminoácido de un resto en dicho dominio III de SAH para un aminoácido que está conservado entre proteínas seroalbúmina de dos o más especies diferentes del ser humano seleccionadas del grupo que consiste en cerdo, rata, ratón, perro, conejo, vaca, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo.

25 293. La colección del punto 291 o 292, en la que dicha al menos una sustitución de aminoácido está en el bucle 2 del dominio III de SAH.

294. La colección de cualquiera de los puntos 291-293, en la que dicha al menos una sustitución de aminoácido está en el bucle 3 del dominio III de SAH.

30 295. La colección de cualquiera de los puntos 291-294, en la que dicha al menos una sustitución de aminoácido está en el bucle 6 del dominio III de SAH.

296. La colección de cualquiera de los puntos 291-295, en la que dicha al menos una sustitución de aminoácido está en la hélice 7 del dominio III de SAH.

35 297. La colección de cualquiera de los puntos 291-296, en la que dicha al menos una sustitución de aminoácido está en el bucle 7 del dominio III de SAH.

298. La colección de cualquiera de los puntos 291-297, en la que dicha al menos una sustitución de aminoácido está en la hélice 8 del dominio III de SAH

299. La colección de cualquiera de los puntos 291-298, en la que dicha al menos una sustitución de aminoácido está en el bucle 8 del dominio III de SAH.

40 300. La colección de cualquiera de los puntos 291-299, en la que dicha al menos una sustitución de aminoácido está en el bucle 9 del dominio III de SAH.

301. La colección de cualquiera de los puntos 282-300, donde cada uno de dicha pluralidad de polipéptidos comprende además al menos una parte del dominio I de SAH; o al menos una parte del dominio II de SAH; o al menos una parte del dominio I de SAH y al menos una parte del dominio II de SAH.

45 302. La colección de cualquiera de los puntos 282-301, en la que la colección es una colección de presentación.

303. La colección del punto 302, en la que el tipo de colección de presentación se selecciona del grupo que consiste en levadura, fago y mamífero.

50 304. Un método de cribado de la colección de cualquiera de los puntos 282-303, comprendiendo dicho método: (a) seleccionar una pluralidad de polipéptidos para el cribado; (b) cribar los polipéptidos con afinidad de unión aumentada por FcRn o semivida en suero aumentada; y (c) determinar la secuencia de los polipéptidos con afinidad de unión aumentada por FcRn o semivida en suero aumentada.

6. Ejemplificaciones

55 La invención que se está describiendo ahora en líneas generales, se entenderá más completamente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen simplemente con fines de ilustración de determinados aspectos y realizaciones de la presente invención, y no pretenden limitar la invención. Por ejemplo, las construcciones particulares y diseño experimental divulgados en este documento representan herramientas y métodos ejemplares para validar la función apropiada. Por tanto, será fácilmente evidente que cualquiera de las construcciones específicas divulgadas y plan experimental pueden sustituirse dentro del alcance de la presente divulgación.

60 Además, se apreciará que un listado específico o descripción de un equipo y reactivos particulares usados, los tamaños, fabricante, etc., no deben considerarse limitantes de la presente invención salvo que se indique específicamente de esa manera. Se apreciará además que puede sustituirse fácilmente otro equipo y reactivos que funcionan de forma similar.

65

6.1 Ejemplo 1: Análisis cinético y de afinidad de la unión a FcRn humano al dominio III de seroalbúmina humana (SAH)

Este ejemplo mide las constantes de asociación, disociación y afinidad en equilibrio del dominio III de SAH por FcRn humano usando resonancia de plasmones superficiales (SPR). El dominio III (también abreviado como "DIII") es un fragmento de la proteína seroalbúmina humana que abarca los restos de aminoácidos 381-585. La secuencia de aminoácidos del dominio III se expone en la SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos de SAH madura de longitud completa se expone en la SEQ ID NO: 2. Para su uso en estos experimentos, el dominio III se expresó y purificó de *Pichia pastoris*.

6.1.1 Expresión y purificación de proteína recombinante

El plásmido recombinante que codifica el gen del dominio III se obtuvo de Geneart AG, Regensburg, Alemania. El gen del dominio III se escindió del vector proporcionado por el proveedor usando las enzimas de restricción EcoRI y NotI y se clonó en el vector de expresión de *Pichia* pPICZ-alpha-A (Invitrogen, n.º de Catálogo V195-20). La proteína del dominio III recombinante se expresó, de la manera resumida en las instrucciones del fabricante. La proteína del dominio III recombinante se secretó en el medio, y se purificó por cromatografía de interacción hidrofoba en una columna Hi Trap de Butil-Sepharose Fast Flow de GE Healthcare (n.º de Catálogo 17 5197 01). En resumen, primero se ajustó la salinidad y el pH del medio de cultivo a sulfato de amonio 1,5 M y fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0. El medio de cultivo se filtró y se pasó sobre la columna de butil-sepharose y el dominio III unido se eluyó usando un tampón de fosfato de sodio de pH 7,0 de baja salinidad. Una fracción de la proteína purificada se deslipidó pasándola sobre una columna de Hidroxialcoxipropil Dextrano (Sigma-Aldrich, n.º de Catálogo H6258) con una camisa de agua en circulación mantenida a 50 °C. La pureza tanto de la forma deslipidada como de la forma no deslipidada fue de un 99 %, como se visualiza por SDS-PAGE al 4-12 % por tinción con azul de Coomassie (figura 1A). La concentración de proteína se determinó por A280. El plegamiento apropiado del dominio III purificado se confirmó por mediciones de UV cercano-CD y UV lejano-CD que se correlacionaban estrechamente con las mediciones publicadas previamente (véase, por ejemplo, Giancola *et al.* International Journal of Biological Macromolecules 20(1997) 193-204).

6.1.2 Medición cinética

Las constantes de velocidad en equilibrio de asociación y disociación se midieron a 25 °C en un instrumento BIAcore T100 (Uppsala, Suecia) y los datos se analizaron usando el programa informático de evaluación BIAcore T100, v. 1.1 (BIAcore, Inc, Uppsala, Suecia). Tanto la forma no deslipidada como la forma deslipidada del dominio III se inmovilizaron covalentemente a densidades de acoplamiento de 1016 y 1184 UR respectivamente en chip CM4 (n.º de catálogo BR-1005-39) o CM5 (n.º de catálogo BR-1000-14) por acoplamiento convencional de amina (BIAcore Handbook, 2002). Una de las celdas de flujo se acopló de forma simulada usando el protocolo de inmovilización idéntico sin proteína para que sirviera como blanco. Todas las inyecciones se hicieron en fosfato 50 mM, pH 5,5 y tampón NaCl 150 mM, y la superficie de chip se regeneró entre inyecciones con solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4. Para medir la constante de asociación (k_{on}), la constante de disociación (k_{off}) y las constantes de disociación en equilibrio (K_D) en un único experimento, se inyectaron concentraciones crecientes de FcRn humano (39 nM-40 μ M) a 50 μ l/min sobre la proteína del dominio III inmovilizada (figura 1B, panel de la izquierda). Se permitió que la unión alcanzara el equilibrio, y las constantes cinéticas k_{on} y k_{off} se obtuvieron por ajuste simultáneo tanto de la fase de asociación (4 min) como de la fase de disociación (1 min) de las curvas al modelo de langmuir 1:1. La K_D se obtuvo ajustando el diagrama de la respuesta de unión en equilibrio (Req) frente a la concentración de analito a un modelo de afinidad en equilibrio usando análisis de regresión no lineal (figura 1B, panel de la derecha). Tanto la forma deslipidada como la forma no deslipidada del dominio III mostraron sensogramas de unión y diagramas de Req frente a concentración de ligando similares.

La interacción de FcRn con el dominio III muestra una rápida cinética de asociación ($k_{on} \approx 7e^3$) y disociación ($k_{off} \approx 4e^2$) (tabla 1). La K_D de FcRn para el dominio III es entre 5-8 μ M que es aproximadamente 7 veces mayor, (por ejemplo, una constante de disociación mayor) que la de SAH de longitud completa por FcRn (tabla 1). Esta diferencia en la K_D se debe en gran medida a la k_{off} más rápida para el dominio III respecto a SAH mientras que k_{on} para ambas moléculas es comparable. La K_D obtenida de la k_{on} y k_{off} están muy de acuerdo con los valores obtenidos experimentalmente que corroboran de ese modo las mediciones cinéticas. Además, dos tipos diferentes de chips detectores (CM4 y CM5) con restos carboxi variables dieron afinidades similares. Las constantes cinética y en equilibrio son comparables entre las formas deslipidada y no deslipidada del dominio III, lo que sugiere que las moléculas lipídicas no median o facilitan la unión de FcRn al dominio III.

Tabla 1. La tabla proporciona las constantes cinéticas en equilibrio obtenidas por SPR para la unión de FcRn humano al dominio III de seroalbúmina humana (SAH) y la comparación con constantes cinéticas publicadas para SAH de longitud completa (panel inferior).

DIII inmovilizado	Chip detector	Análisis cinético			Análisis en equilibrio
		k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	k_D (μM)	k_D (μM)
Deslipidado	CM4	7,7e3	6,5e-2	8,5	7,9
	CM5	7,2e3	5,1e-2	7,1	6,0
	CM5	7,4 e3	4,7e-2	6,3	5,5
No deslipidado	CM4	7,3 e3	6,6e-2	9,1	8,4
	CM5	7,8 e3	6,5e-2	6,3	6,6
	CM5	7,9 e3	4,9e-2	5,7	6,2
SAH inmovilizada	CM5	9,3e3	4,5e-3	0,74	1,2

5 6.2 Ejemplo 2: La fusión con SAH de longitud completa o el dominio III en solitario potencia la afinidad de IgG humana por FcRn

Este experimento demostró que la fusión del dominio III de SAH a una proteína terapéutica o anticuerpo, o una variante del mismo, potenció la afinidad de la proteína terapéutica/anticuerpo por FcRn a pH ácido sin influir en la dependencia del pH de la interacción. Este aumento en la afinidad por FcRn a pH 5,5 probablemente se traduce en una semivida en suero aumentada (por ejemplo, una vida útil potenciada *in vivo* o en un sistema de modelo apropiado). Las mediciones farmacocinéticas de la semivida de una parte de SAH que comprende el dominio III fusionado a una proteína terapéutica pueden realizarse en, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan una única copia del gen de FcRn humano (pero que carecen de FcRn murino) para evaluar los efectos de la semivida de la fusión con una proteína que comprende el dominio III de tipo silvestre o variante.

6.2.1 Diseño de la construcción

Como proteína representativa, se usó IgG 1 humana para comparar la afinidad por FcRn entre IgG en solitario e IgG fusionada con SAH o el dominio III. La SAH o el dominio III se fusionó al extremo C de la cadena pesada de IgG 1 humana mediante un conector que comprende 4 unidades repetitivas de Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (figura 2A). La longitud del conector se diseñó basándose en la distancia entre el sitio de unión de IgG y el sitio de unión de SAH en FcRn para permitir que ambos ligandos se unieran simultáneamente a sus respectivos sitios de unión. Una versión de fusión de SAH y el dominio III de una variante de alta afinidad descrita previamente de IgG (IgG-YTE, véase Dall'Acqua, *et al.*, 2002, J Immunol., 169:5171-5180) que muestra una afinidad mejorada 10 veces por FcRn, respecto a IgG natural, también se creó de una manera similar. Por consiguiente, se generaron y usaron las siguientes construcciones:

30 IgG
 IgG(YTE)
 IgG-(G₄S)₄-SAH
 IgG-(G₄S)₄-dominio III
 IgG(YTE)-(G₄S)₄-SAH
 35 IgG(YTE)-(G₄S)₄-dominio III

6.2.2 Purificación y caracterización

En resumen, las 6 construcciones se clonaron en un vector de expresión y las proteínas se purificaron por expresión transitoria en células 293F (GIBCO n.º Cat. R79007). La IgG 1 y las proteínas de fusión secretadas en el medio de cultivo se purificaron usando una columna de afinidad de proteína A HiTrap™ (n.º de catálogo 17-0403-03) de GE Healthcare. Las proteínas purificadas se resolvieron por SDS-PAGE tanto en condiciones reductoras como en condiciones no reductoras, y se observó una pureza de un 99 %, como se visualiza por tinción de Coomassie (figura 2B).

45 Los pesos moleculares estimados de la proteína de fusión IgG-(G₄S)₄-SAH es de 284 kilodalton (kDa) mientras que los de IgG-(G₄S)₄-dominio III es de 196 kDa. Los pesos moleculares observados se correlacionaban muy bien con estas estimaciones. Para evaluar si estas proteínas de fusión forman agregados debido a su mayor tamaño o propiedades fisicoquímicas alteradas, las proteínas de fusión se analizaron por cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) usando SEC Agilent Technologies 1200 series SEC (figura 2C). Tanto IgG-(G₄S)₄-SAH como IgG-(G₄S)₄-dominio III muestran un único pico en un diagrama de A280 frente al tiempo de retención (min)

correspondiente a un monómero, lo que indica que la proteína de fusión no se agrega a ningún grado medible. Los perfiles de SEC de las proteínas de fusión para la variante IgG-YTE eran distinguibles de las proteínas quiméricas IgG-(G₄S)₄-SAH o IgG-(G₄S)₄-SAH.

5 6.2.3 Medición de las constantes de unión en equilibrio (K_D)

La afinidad (K_D) de FcRn humano por las proteínas de fusión se midió en un instrumento BIAcore T100 (Uppsala, Suecia). En resumen, se inmovilizó IgG, IgG-(G₄S)₄-dominio III, IgG-(G₄S)₄-SAH, IgG-YTE, IgG-YTE-(G₄S)₄-dominio III y IgG-YTE-(G₄S)₄-SAH a alta densidad en celdas de flujo diferentes en dos chips detectores Series 5 (GE Healthcare), usando química convencional de acoplamiento amino como se resume por el fabricante del instrumento. Las densidad superficiales finales de IgG fueron 5116, 5258, 6097, 5256, 5561 y 5531 UR, respectivamente. También se preparó una celda de flujo de referencia en cada chip detector sin ninguna proteína usando el protocolo de inmovilización idéntico. Se inyectaron diluciones en serie de factor dos de FcRn humano, que varían de 5,86 nM a 3000 nM, en PO₄ 50 mM, tampón NaCl 150 mM a pH 5,5 sobre las superficies de la celda de proteína acoplada y de referencia a un caudal de 5 µl/min. Los datos de unión se recogieron durante 50 minutos, seguido por regeneración con múltiples inyecciones de 60 segundos de solución salina tamponada con fosfato pH 7,4 que contenía Tween20 al 0,05 %. La respuesta de unión en equilibrio (R_{eq}) para cada inyección se representó frente a la concentración y se ajustó a un segundo modelo de afinidad en equilibrio (figura 3), usando el programa informático de evaluación BIAcore T100, v. 1.1 (BIAcore, Inc, Uppsala, Suecia) para obtener la constante de unión en equilibrio K_D . El recuadro representa la unión de una gama de concentraciones de FcRn a los ligandos inmovilizados. La K_D para la variante IgG-YTE y las proteínas de fusión correspondientes también se obtuvieron de manera idéntica (datos no mostrados).

La K_D de IgG-(G₄S)₄-SAH es 183 nM y la de IgG-(G₄S)₄-dominio III es 305 nM en comparación con 1,51 µM para IgG en solitario, lo que demuestra que fusionar SAH o el dominio III a IgG mejora la afinidad por FcRn en 10 y 5 veces, respectivamente (tabla 2). También se observa una tendencia similar aún menos pronunciada para las variantes de YTE donde la IgG-YTE-(G₄S)₄-SAH presenta 3,8 veces (42,5 nM) e IgG-YTE-(G₄S)₄-dominio III muestra 2,5 veces (65,1 nM) de mejora en la afinidad respecto a IgG-YTE (tabla 2).

30 **Tabla 2.** La tabla proporciona las constantes en equilibrio obtenidas por SPR para la unión a FcRn humano para IgG fusionada con SAH o IgG fusionada con el dominio III, así como sus análogos de variante de YTE a pH 5,5.

Construcción	K_D (nM)
IgG	1510
IgG-(G4S)4-SAH	183
IgG-(G4S)4-DIII	305
IgG-YTE	161
IgG-YTE-(G4S)4-SAH	42,5
IgG-YTE-(G4S)4-DIII	65,1

La mejora en la afinidad a pH 5,5, sin embargo, no influye en la unión a FcRn a pH neutro. Esto se ensayó inyectando FcRn 1 µM a pH 7,2 sobre la misma superficie inmovilizada. No se detectó diferencia medible en la unión a FcRn para ninguna de las superficies de proteína de fusión acoplada (datos no mostrados) en comparación con los controles de IgG/IgG-YTE.

La unión de las fusiones de SAH a FcRn a pH ácido (-5,5-6,0) y la liberación a pH neutro (~7,4) se correlaciona con la eficacia *in vivo* ya que dichas características imitan la unión *in vivo*. Por consiguiente, las variantes de SAH preferidas son (i) variantes con afinidad mejorada respecto a SAH natural o conjugados que incluyen SAH natural y (ii) variantes para las que se observa afinidad mejorada a pH ácido. Además, las variantes con afinidad de unión aumentada por FcRn a pH neutro pueden comprometer la eficacia y disminuir los efectos beneficiosos de la afinidad aumentada a pH ácido.

45 6.3 Ejemplo 3: La fusión con SAH de longitud completa potencia la persistencia en suero de IgG humana

Este experimento demostró que la fusión de SAH a un anticuerpo aumentaba la semivida en suero de un anticuerpo. Como se muestra en la figura 7, la persistencia en suero de la fusión IgG-SAH descrita en el ejemplo 1 se aumentaba en comparación con IgG en solitario. Este aumento en la semivida en suero fue comparable a la observada para la variante IgG-YTE. Sin embargo, la adición de SAH a la variante IgG-YTE no parecía provocar una potenciación significativa sobre YTE en solitario en este estudio.

El estudio de PK se realizó usando ratones C57BL/6 transgénicos para FcRn humano de 4-5 meses de edad (JAX laboratories) que tienen los receptores Fc neonatales de ratón (FcRn) remplazados con una única copia de FcRn

humano (huFcRn). A los ratones se les inyecta mediante la vena de la cola una dosis de 15 mg/kg de la proteína apropiada diluida en solución salina tampona con fosfato pH 7,2. Todo los animales se exanguinan del plexo retroorbital para recoger (75 µl) suero 1 hora después de la inyección para determinar la cantidad real inyectada en la circulación. Después se recogen muestras de suero a las 24, 72, 168 y 240 horas después de la inyección y se almacenan a -80 °C. La cantidad de la proteína indicada que permanece en suero se analiza por ELISA. En resumen, se usan placas recubiertas con anti-SAH para capturar las diversas construcciones de fusión de IgG y se detectan usando anticuerpo de detección anti-Kappa. Para las construcciones de IgG e YTE, se usan placas recubiertas con antígeno para capturar la IgG y se detectan usando un anticuerpo de detección anticadena pesada. El % de proteína que permanece en el suero se representa como una fracción de cantidad inyectada (muestra de 1 hora) frente al tiempo.

6.4 Ejemplo 4: El epítipo en SAH para FcRn es conformacional

Se observó que FcRn humano se une a SAH natural bien, de una manera dependiente de la concentración, como se visualiza por inmunotransferencia con anticuerpo anti-β-2microglobulina. Sin embargo, no se observaron resultados similares usando SAH desnaturalizada ensayada en condiciones experimentales similares.

Se inmovilizó seroalbúmina humana (SAH; n.º de catálogo A-8763), IgG humano (hIgG; n.º de catálogo I-4506) de Sigma-Aldrich, tampón Tris, en Sepharose 4B activado por CNBr (GE HealthCare) a 10 mg de proteína/ml de Sepharose. Se preparó Sepharose-Tris bloqueando los grupos reactivos de Sepharose 4B activado por CNBr con base Trizma 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8. Las microesferas de Sepharose unidas a SAH, hIgG o Tris (20 µl de microesferas equivalente a ~180 µg de proteína unida) se hirieron durante 10 minutos en presencia de tampón de muestra que contenía SDS (Tris 60 mM, pH 6,8, SDS al 2,3 %, glicerol al 10 %, azul de bromofenol al 0,01 %) en condiciones reductoras (2-mercaptoetanol al 1 %) o no reductoras o se dejaron sin tratar. Las microesferas acopladas a proteína o Tris así tratadas se lavaron con fosfato de sodio 50 mM, tampón NaCl 150 mM que contenía gelatina de pescado al 0,1 % (BIOFX Laboratories Inc, n.º de catálogo PFGP-1000-01) a pH 5,5 y después se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con 200 µl de concentraciones variables de FcRn humano (0-20 µg) en tampón a pH 5,5. La proteína no unida se lavó usando tampón de pH 5,5. La proteína unida se eluyó hirviendo con tampón de muestra que contenía SDS que contenía 2-mercaptoetanol al 1 % y se analizó en un gel de poliacrilamida con SDS seguido por inmunotransferencia con anticuerpo anti-β-2microglobulina (Abcam n.º de catálogo Ab6608).

La unión de FcRn humano a Sepharose-SAH fue máxima para la SAH natural para todo el intervalo de concentración de FcRn. Sin embargo, la unión se disminuyó drásticamente cuando se desnaturaliza la SAH en condiciones tanto reductoras como no reductoras, lo que sugiere que el epítipo en SAH para FcRn es muy probablemente un epítipo conformacional. (Figura 4). Como se esperaba, la Sepharose-IgG se unió a FcRn humano, mientras que las microesferas bloqueadas con Tris no se unieron a FcRn en ninguna condición.

6.5 Ejemplo 5: La SAH y el dominio III pueden presentarse en la superficie de células de levadura y las proteínas presentadas retienen la capacidad de unión a FcRn

Este ejemplo demuestra que la SAH y el dominio III pueden expresarse satisfactoriamente sobre la superficie de células de levadura y también que estas proteínas presentadas se unen a FcRn de una manera dependiente del pH, que se evalúa por citometría de flujo modificada realizada a pH ácido. Por tanto, la expresión en células de levadura proporciona un método para cribar construcciones (por ejemplo, dominio III en solitario, SAH de longitud completa, SAH truncada o polipéptido quimérico que comprende al menos el dominio III) que contienen una variación en el dominio III para evaluar la capacidad de dichas construcciones (i) de unirse a FcRn y (ii) de unirse a FcRn con afinidad aumentada respecto a, por ejemplo, construcciones no variantes.

6.5.1 Presentación en superficie celular de levaduras

La SAH, el dominio III o un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv), se clonaron en un vector de presentación en levadura pYD1 (Invitrogen n.º de catálogo V835-01) y se transformaron en *S. cerevisiae* para la presentación en la superficie celular de levadura. El pYD1 presenta la proteína de interés como una fusión en el extremo C con la proteína Aga2p de *S. cerevisiae* bajo el control de un promotor inducible por galactosa. Todos los procedimientos experimentales se realizaron como se describe en el manual del proveedor. Las células transformadas se seleccionaron usando los marcadores de selección auxotróficos uracilo y triptófano, y se cultivaron en medio de selección apropiado (Teknova Inc., n.º de catálogo C8140). Los cultivos se indujeron con galactosa durante hasta 48 horas para permitir la expresión de proteínas de fusión de Aga2p. Se tomaron muestras de las células a 0, 24 y 48 horas. Las muestras celulares se lavaron y bloquearon con PBS pH 7,2 que contenía gelatina de pescado al 0,1 %, se tiñeron con anticuerpo policlonal de conejo anti-SAH conjugado con FITC (Abcam Inc., n.º de catálogo AB34669) y se analizaron por citometría de flujo.

No se observó expresión en superficie celular de SAH o el dominio III a las 0 horas, mientras que se observó expresión de ambas proteínas en las células de levadura a las 24 horas. Dicha expresión se mantuvo a las 48 horas después de la inducción. La expresión se visualizó por tinción FITC positiva. La figura 5A muestra que tanto SAH

como el dominio III pueden expresarse satisfactoriamente en la superficie de células de levadura. Las células transformadas con scFv no se tiñeron (por ejemplo, fueron negativas) con anti-SAH, como se esperaba. Por tanto, las células transformadas con scFv sirvieron como control negativo.

5 6.5.2 Capacidad de unión a FcRn de SAH o dominio III expresado en superficie

10 Las células de levadura que expresan SAH, el dominio III o scFv y se indujeron con galactosa durante 48 horas se bloquearon con fosfato de sodio 50 mM, pH 5,5, tampón NaCl 150 mM (también mencionado como tampón de FACS) que contenía gelatina de pescado al 0,1 % durante 1 hora. Las células entonces se incubaron con FcRn biotinilado (70 μ M) en tampón fosfato pH 5,5 y el FcRn unido se visualizó usando Estreptavidina ficoeritrina (PE) (Invitrogen Inc.). Las células teñidas de esta manera se analizaron por citometría de flujo con fosfato de sodio 50 mM, pH 5,5, tampón NaCl 150 mM en lugar de la PBS usada habitualmente.

15 Las células que expresan tanto SAH como el dominio III se tiñeron de forma positiva para PE, mientras que las células que expresan scFv de control negativo no, como puede observarse por el desplazamiento en el histograma en comparación con el de scFv (figura 5B), lo que demuestra que la SAH y el dominio III expresados en superficies de célula de levadura retienen la capacidad de unión a FcRn y, por lo tanto, son funcionales. En un experimento independiente, las células se trataron de forma similar que la citometría de flujo de bajo pH para la unión de FcRn y se ensayaron usando una técnica de muestreo de alto rendimiento, el sistema HyperCyt® (IntelliCyt Corporation) con resultados similares.

6.6 Ejemplo 6 Vectores adenovíricos de presentación en superficie de células de mamífero que comprenden OriP para generar colecciones con alta diversidad

25 Se construyó una colección de presentación en superficie de mamífero usando un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) para la presentación en superficie de proteínas scFv-Fc en un vector de introducción Gateway® que se genomanipuló para que contuviera un casete de expresión de scFv-Fc denominado pENDisplay (véase la figura 8A). La colección de diferentes secuencias de scFv se inserta fácilmente en los sitios Sfi/NotI. La colección en el vector pENDisplay se combinó con el vector pAd/PL-DEST™ (Invitrogen n.º Cat. V494-20) según el fabricante para generar una colección de expresión en adenovirus, se obtuvo un total de $\sim 5 \times 10^6$ unidades formadoras de colonia (ufc). Para generar adenovirus, se transfectaron células 293A (Invitrogen n.º Cat. R70507), que contienen una copia integrada de forma estable del gen E1 que suministra las proteínas E1 (E1a y E1b) necesarias para generar adenovirus recombinantes en trans, con la colección de expresión en adenovirus que se ha linealizado para exponer las repeticiones terminales invertidas (ITR) de la izquierda y la derecha. Al menos un 50 % de las células 293A transfectadas directamente con la colección de adenovirus linealizado se encontró que presentaban anticuerpo en su superficie por análisis FACS. Sin embargo, cuando la colección de adenovirus linealizado se transfectaba en células 293A para la producción de adenovirus, se obtuvieron menos de 50 placas por placa de 110 mm (diámetro). El adenovirus se recogió en día 10 y se aisló el ADN vírico, se usó PCR para amplificar la región codificante de scFv que se volvió a clonar de nuevo en el vector pENDisplay, se recogieron 96 colonias y se secuenciaron. Únicamente 14 secuencias VH únicas se identificaron de los 96 clones analizados. La baja eficacia de recuperación de placas puede deberse a la degradación del vector adenovírico linealizado y provoca una reducción significativa en la complejidad de la colección de adenovirus.

45 El antígeno 1 nuclear de Epstein-Barr (EBNA-1) contiene una señal de localización nuclear (NLS) y se une a ácidos nucleicos que contienen OriP tales como plásmidos. La proteína EBNA-1 (véase la figura 9A) puede ayudar a translocar los ácidos nucleicos que contienen OriP al núcleo mediante la NLS y potencia el mantenimiento episómico. Aunque no se cree que el mantenimiento episómico sea necesario para el rescate del adenovirus, se introdujo una secuencia OriP (véase la figura 9C) después de la secuencia poliA del casete scFv-Fc entre las secuencias attL1 y attL2, del vector pENDisplay. El nuevo vector denominado pENDisplay-OriP se representa en la figura 8B. La colección en el pENDisplay-OriP se combinó con el vector pAd/PL-DEST™ (Invitrogen n.º Cat. V494-20) para generar una segunda colección de expresión en adenovirus que también tiene $\sim 5 \times 10^6$ ufc. La colección generada a partir de vector pENDisplay-OriP se linealizó y se transfectó en células 293E (Invitrogen n.º Cat. R620-07), que expresa de forma estable el antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr (EBNA-1) y la proteína E1a adenovírica, que produce mucho más de 10 000 placas por placa de 110 mm (diámetro). El virus se recogió en el día 7 y se analizaron 96 clones como se describe anteriormente. En contraste con la baja cantidad de clones únicos aislados de la primera colección, sin un sitio OriP, las 96 secuencias VH analizadas eran únicas. En conjunto estos resultados demuestran que la adición de la secuencia OriP al vector de la colección de expresión en adenovirus potenciaba enormemente tanto el rescate del adenovirus de las células que expresan EBNA-1 como la diversidad de la colección de adenovirus.

60 La adición de la secuencia OriP (por ejemplo, figura 9C) a un vector adenovírico potencia la eficacia de generación de partículas adenovíricas recombinantes de células hospedadoras en presencia de proteína EBNA-1. Cuando se construyen colecciones de expresión en adenovirus, la eficacia potenciada de generación de virus mantiene la diversidad/complejidad de la colección reduciendo la cantidad de clones perdidos. Ejemplo 7, a continuación, detalla la construcción y cribado de una colección de presentación en superficie de mamífero que expresa variantes del

65

dominio III de SAH que incorpora la secuencia OriP en un vector de expresión adenovirico esencialmente como se describe anteriormente.

La figura 10 proporciona un esquema de un vector de expresión adenovirico genérico representativo para la expresión de una o más proteínas de interés. En este ejemplo, se proporciona un genoma adenovirico mutante en que las partes E1 y/o E3 están eliminadas. Los genes víricos perdidos se proporcionan en trans por la célula hospedadora usada para el rescate del virus. Las eliminaciones evitan la replicación del adenovirus en la célula hospedadora usada para la expresión de la una o más proteínas de interés. El ADN de interés incluirá todos los componentes necesarios para la expresión de la una o más proteínas incluyendo, aunque sin limitación, la una o más secuencias, codificantes, una o más secuencias promotoras, una o más señales de terminación, una o más secuencias poliA, etc. Las proteína o proteínas de interés pueden ser solubles o pueden incluir una secuencia que anclará la una o más proteínas a la superficie celular, tal como un dominio transmembranario o una señal de anclaje de GPI. Como se ejemplifica en este documento, los vectores adenoviricos pueden genomanipularse para que expresen una colección de proteínas variantes. El vector de expresión de adenovirus representado en la figura 10 proporciona la ubicación de sitios de recombinación att que se producirían usando plásmidos de entrada y destino Gateway™ para su construcción. También se representa una posible ubicación donde podría ubicarse una secuencia de ADN de EBNA-1. se contemplan otras ubicaciones y orientaciones para los componentes del vector. Un experto en la materia entenderá que la orientación y/o posición relativa de las regiones del vector pueden variarse.

6.7 Ejemplo 7 Uso de otras plataformas de presentación para SAH y el dominio III

Las tecnologías de presentación en fagos y presentación en superficie celular de mamífero también se evaluaron como plataformas potenciales de presentación para SAH y el dominio III. Una plataforma de presentación en fagos no expresaba SAH y el dominio III en la superficie de las células bacterianas, supuestamente debido a la abundancia de enlaces disulfuro en estas moléculas (datos no mostrados). Sin embargo, el sistema de presentación en células de mamífero usando expresión superficial transitoria en células 293-F mediado mediante señal de anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) del factor de aceleración del deterioro (por ejemplo, el DAF mutado como se describe en el documento US 2007/0111260) fue satisfactorio para presentar SAH y el dominio III. Las proteínas presentadas retenían la capacidad de unión a FcRn (datos no mostrados).

Se generó una construcción de expresión en mamífero adicional, denominada pEN-HSA-GPI,, en que se añadió una marca epitópica (por ejemplo, marca Flag) para tinción doble y se añadieron conectores tanto 5' como 3' de la SAH para aumentar la flexibilidad de la proteína de fusión y facilitar la unión de SAH a FcRn (figura 11A), esta construcción se usó directamente para la transfección transitoria o se usó para generar un vector de expresión adenovirico que también incorpora la secuencia OriP, denominado pAd-HSA-GPI. Se expresó SAH funcional en la superficie de células de mamífero (por ejemplo, células 293F) a partir de esta construcción tanto en ensayos de transfección transitoria (datos no mostrados) como usando un sistema de expresión adenovirico. La figura 11 muestra el desplazamiento resultante en el histograma de células teñidas con anti-SAH (figura 11B) o FcRn a 25 µg/ml y 5 µl/ml (figuras 11C y 11D, respectivamente). Por tanto, existen varios sistemas potenciales para expresar SAH y variante del dominio III, y para cribar dichas variantes para (i) la unión a FcRn y (ii) la capacidad de unirse a FcRn con afinidad aumentada respecto a, por ejemplo, construcciones no variantes.

Transfección de células 293F para presentar SAH en la superficie celular: Se añadieron 1,5 µg de plásmido y 2,25 µl de 293fectin a 100 µl de medio Optimem (Invitrogen) en un tubo diferente, se incubaron a TA durante 5 min y después los dos componentes se combinaron juntos. Después de incubación a temperatura ambiente durante 20 min adicionales, la mezcla se añadió a 2 ml de células 293F a una densidad de 1×10^6 células/ml en placa de 24 pocillos profundos. Las células transfectadas se cultivaron durante 24 horas a 250 r.p.m. en presencia de CO₂ al 8 %.

Generación y uso del vector de expresión adenovirico: Se usó la tecnología Gateway® (Invitrogen) para recombinar SAH en el vector de entrada (pEN-HSA-GPI) con el vector de destino de Invitrogen para generar el vector de expresión adenovirico. En resumen, se añadieron 150 ng de vector pEN-HSA-GPI, 300 ng de pAd/PL-DEST (Invitrogen), 2 µl de LR Clonase II (Invitrogen) y tampón TE a un total de 10 µl de mezclas de reacción. Después de incubación a 25 °C durante una noche, se usaron 2 µl de la mezcla de reacción para transformar células competentes One-shot Top 10 (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. Las células TOP 10 transformadas se sembraron en placa de Ampicilina y se incubaron a 37 °C durante una noche. Se recogieron colonias individuales en medio LB para preparar el plásmido. El vector de expresión adenovirico que contenía el gen de SAH se linealizó con Pac I antes de la transfección para generar el adenovirus. Se usaron 2 µg de vector adenovirico linealizado y 6 µl de lipofectamine-2000 para transfectar células 293F para producir el adenovirus. A los 7 días después de la transfección, el adenovirus se liberó de las células transfectadas alternando congelación (a -80 °C) y descongelación (a 37 °C) 2-3 veces. Los desechos celulares se retiraron por centrifugación a 3000 r.p.m. durante 10 minutos y el sobrenadante que contenía adenovirus se separó en alícuotas en los nuevos tubos y se almacenaron a -80 °C. La concentración vírica se determinó usando el kit de valoración rápida Adeno-XTM (Clontech:PT3651-2) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El adenovirus se usó a una MOI de 1 para expresión de construcciones de SAH.

6.8 Ejemplo 8: Mutagénesis por barrido de alanina de bucles expuestos en superficie en DIII para identificar el epítipo de unión a FcRn

Este ejemplo resume la función de los bucles expuestos en la superficie en el dominio III en la mediación de la unión de FcRn a SAH.

El dominio III está compuesto de 205 restos de aminoácido y codifica 10 hélices unidas mediante 9 bucles y estabilizadas a través de 6 enlaces disulfuro (Sugio *et al.* 1999, Protein Eng. 12:439-46 y PDB: 1BM0). Las posiciones de los restos de aminoácido que comprenden estos bucles, así como la longitud de cada bucle se enumeran a continuación. La numeración de aminoácidos es respecto a la posición de estos bucles en la proteína SAH madura de longitud completa (SEQ ID NO: 2).

Bucle 1: restos 398-400 = 3 aminoácidos
 Bucle 2: restos 415-419 = 5 aminoácidos
 Bucle 3: restos 439-443 = 5 aminoácidos
 Bucle 4: restos 468-470 = 3 aminoácidos
 Bucle 5: restos 480-482 = 3 aminoácidos
 Bucle 6: restos 492-509 = 18 aminoácidos
 Bucle 7: restos 516-517 = 2 aminoácidos
 Bucle 8: restos 537-541 = 5 aminoácidos
 Bucle 9: restos 561-564 = 4 aminoácidos

Los bucles numerados 2, 3, 6, 8 y 9 son accesible al disolvente y están expuestos en la superficie de la molécula (Sugio *et al. ibid.*, y PDB: 1BM0).

En determinados ejemplos, aminoácidos alternativos en cada bucle individual accesible en la superficie se mutan en alanina (excepto prolina y cisteína, que no se mutan) con restos de numeración impar mutados en un conjunto e incluso restos numerados mutados en otro conjunto. Dichos conjuntos mutantes por bucle se crean con la excepción del bucle 9 donde únicamente se necesita una construcción para ajustar el diseño experimental. Se crea un total de 9 de dichas construcciones en un vector para presentación en superficie células (por ejemplo, el vector de presentación en levadura pYD1) y se evaluaron para la capacidad de unión a FcRn. Las variantes pueden evaluarse usando ensayos *in vitro* convencionales descritos en la solicitud (por ejemplo, citometría de flujo). Se identifican una o más variantes que presentan afinidad mejorada por FcRn. Cada variante también puede cribarse para determinar si la afinidad mejorada por FcRn se produce únicamente a pH ácido, pero no a pH neutro. La afinidad mejorada por FcRn a pH ácido, pero no a pH neutro puede ensayarse para (i) construcciones del dominio III variante en solitario; (ii) construcciones del dominio III variante presentadas en el contexto de SAH de longitud completa; o (iii) en el contexto de SAH truncada o un polipéptido quimérico que comprende al menos el dominio III. Lo anterior se compara con el dominio III de tipo silvestre, una SAH de longitud completa de tipo silvestre o polipéptido quimérico sin las mutaciones.

En determinados ejemplos, la información obtenida del cribado anterior identifican restos en los bucles accesibles en la superficie que son susceptibles a variación manteniendo al mismo tiempo (o incluso mejorando) la capacidad de unión a FcRn. Se construye una serie de variantes en que dichas posiciones identificadas se mutan a cada uno de los otros 20 aminoácidos, y dichas variantes también se criban. Posteriormente se construyen variantes adicionales que incluyen mutaciones en más de una posición y se criban.

En determinados ejemplos, se crea una colección de variantes y se evalúa.

6.9 Ejemplo 9: Mutagénesis por barrido de alanina de restos conservados expuestos en la superficie

Los restos de aminoácido accesibles en la superficie conservados en el dominio III entre 13 diferentes especies animales se identificaron por alineación de secuencias de aminoácidos. Dichos restos conservados se mutan individualmente en alanina para determinar su función en la unión a FcRn.

La secuencia de aminoácidos de dominio III de SAH se comparó con secuencias del dominio III de seroalbúmina de 12 especies diferentes incluyendo rata, ratón, bovino, perro, conejo, cerdo, pollo, burro, jerbo de Mongolia, oveja, gato y caballo y se identificaron los restos que están conservados entre todas estas especies (figura 6A-D). Como la SAH de pollo es distinta de las proteínas SAH de mamífero, se proporciona una segunda alineación de solamente las especies de mamífero (figura 6E-H). La seroalbúmina de cerdo, rata, ratón, perro, oveja, conejo y bovino ya ha demostrado unirse a FcRn humano por ELISA, inmunotransferencia y SPR (datos no mostrados). En un análisis diferentes, los restos expuestos en la superficie en el dominio III se identificaron usando el programa informático GETAREA 1.0 beta disponible en internet (<http://curie.utmb.edu/getarea.html>). Este programa informático calcula las áreas superficiales accesibles de átomos individuales y sus gradientes y valores de cada resto de aminoácido para la probabilidad de accesibilidad superficial expresada como "i" u "o", que indica inaccesible o accesible respectivamente (tabla 3). Se identificaron los aminoácidos que están tanto conservados entre todas estas especies

diferentes como expuestos en la superficie, se calculan por el programa informático y se confirman por inspección visual de la estructura cristalina de SAH (en recuadro en la tabla 3).

- 5 Los 18 restos aminoácido así identificados se mutan individualmente en alanina y se evalúan para el impacto sobre la unión a FcRn usando presentación en superficie celular (por ejemplo, el sistema de presentación en levadura pYD1). Las mutaciones del dominio III se introducen y criban en el contexto de uno o más de los siguientes: dominio III en solitario, la proteína SAH completa, SAH truncada o un polipéptido quimérico que comprende al menos el dominio III. La cisteína y las prolinas expuestas en la superficie conservadas no se incluyen en el análisis.
- 10 En otro ejemplo, los 18 restos de aminoácido (o menos de los 18 si el experimento con alanina indica que posiciones particulares no pueden tolerar una sustitución) se mutan individualmente a cada uno de los otros 19 restos de aminoácido y se evalúan para el impacto sobre la unión a FcRn usando el sistema de presentación en levadura pYD1 (u otro sistema de presentación).
- 15 En otro ejemplo, se construyen y evalúan variantes que incluyen combinaciones de mutaciones. Las variantes pueden evaluarse usando ensayos *in vitro* convencionales descritos en la solicitud (por ejemplo, citometría de flujo). Se identifican una o más variantes que presentan afinidad mejorada por FcRn. Cada variante también puede cribarse para determinar si la afinidad mejorada por FcRn se produce únicamente a pH ácido, pero no a pH neutro. La afinidad mejorada por FcRn a pH ácido, pero no a pH neutro se ensaya para uno o más de los siguientes (i) construcciones del dominio III variante en solitario; (ii) construcciones del dominio III variante en el contexto de SAH de longitud completa o (iii) en el contexto de SAH truncada o un polipéptido quimérico que comprende al menos el dominio III. Lo anterior se compara con el dominio III de tipo silvestre, SAH de longitud completa de tipo silvestre o polipéptido quimérico sin las mutaciones.
- 20 **Tabla 3.** La tabla representa el parámetro de accesibilidad del disolvente para todos los aminoácidos del dominio III. Los restos (numerados con respecto a la secuencia de SAH de longitud completa madura presentada en la SEQ ID NO: 2) que están conservados entre todas las especies alineadas de la figura 6A-D se muestran en negrita y marcados (##) y los restos que están tanto accesibles en la superficie como conservados entre todas las especies alineadas están en recuadro. <http://curie.utmb.edu/getarea.html>.
- 25 Además, los restos que están conservados en todas las especies alineadas en la figura 6E-H, excepto pollo, están marcados (@@).
- 30

Los restos se indican como (i) y (o), que indica inaccesible y accesible en la superficie, respectivamente.

	Resto	Total	Apolar	Estructura	Cadena lateral	Relación (%)	Dentro/fuera	
@@	LEU	380	56,42	56,02	0,75	55,67	38,1	
@@	VAL	381	19,57	19,57	0,00	19,57	16,0	d
	GLU	382	99,24	31,30	0,67	98,57	69,8	f
	GLU	383	69,94	52,61	5,53	64,41	45,6	
@@	PRO	384	0,05	0,05	0,00	0,05	0,1	d
	GLN	385	82,77	29,73	6,62	76,15	53,0	f
	ASN	386	78,25	23,65	1,24	77,01	67,4	f
@@	LEU	387	32,41	32,41	3,66	28,75	19,7	d
	ILE	388	11,04	11,04	2,42	8,62	5,9	d
	LYS	389	98,41	62,10	0,70	97,71	59,4	f
	GLN	390	119,91	30,84	1,91	117,99	82,1	f
	ASN	391	24,47	5,20	0,08	24,39	21,3	
##	CYS	392	5,45	2,53	0,11	5,34	5,2	d
	GLU	393	99,50	48,97	2,36	97,14	68,8	f
	LEU	394	63,00	63,00	0,87	62,13	42,5	
	PHE	395	31,26	30,80	0,46	30,80	17,1	d
@@	GLU	396	114,69	53,25	27,05	87,64	62,1	f
	GLN	397	140,39	48,20	36,11	104,28	72,6	f
	LEU	398	37,07	28,66	11,72	25,35	17,3	d

ES 2 678 144 T3

		Resto	Total	Apolar	Estructura	Cadena lateral	Relación (%)	Dentro/fuera
##	GLY	399	38,33	37,17	38,33	0,00	44,0	
	GLU	400	67,29	26,00	3,58	63,71	45,1	
@@	TYR	401	45,66	45,21	0,90	44,76	23,2	
	LYS	402	110,95	67,17	1,41	109,53	66,6	f
##	PHE	403	0,77	0,77	0,00	0,77	0,4	d
@@	GLN	404	2,71	0,00	0,00	2,71	1,9	d
@@	ASN	405	11,20	10,68	0,03	11,17	9,8	d
@@	ALA	406	27,44	24,63	11,95	15,49	23,9	
	LEU	407	4,22	4,22	0,00	4,22	2,9	d
	LEU	408	0,25	0,25	0,00	0,25	0,2	d
@@	VAL	409	21,68	21,68	0,09	21,59	17,7	d
	ARG	410	71,52	60,94	5,56	65,95	33,7	
##	TYR	411	7,20	1,62	0,00	7,20	3,7	d
##	THR	412	0,05	0,05	0,00	0,05	0,1	d
	LYS	413	25,26	23,68	3,75	21,51	13,1	d
##	LYS	414	11,99	7,84	0,02	11,97	7,3	d
	VAL	415	0,20	0,20	0,04	0,16	0,1	d
##	PRO	416	3,69	2,47	1,22	2,47	2,3	d
	GLN	417	52,78	30,06	14,94	37,84	26,3	
##	VAL	418	3,63	3,62	1,19	2,44	2,0	d
@@	SER	419	54,77	51,36	9,44	45,33	58,6	f
##	THR	420	9,84	7,74	0,88	8,96	8,4	d
@@	PRO	421	101,86	100,54	10,53	91,33	86,8	f
@@	THR	422	11,77	1,22	0,72	11,04	10,4	d
##	LEU	423	1,05	1,05	0,00	1,05	0,7	d
@@	VAL	424	5,56	5,56	0,00	5,56	4,5	d
	GLU	425	66,36	34,10	4,64	61,72	43,7	
	VAL	426	0,54	0,54	0,00	0,54	0,4	d
	SER	427	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	d
@@	ARG	428	28,01	6,40	0,00	28,01	14,3	d
	ASN	429	27,74	1,54	0,00	27,74	24,3	
@@	LEU	430	7,30	7,09	0,21	7,09	4,9	d
@@	GLY	431	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	d
	LYS	432	80,30	40,11	0,01	80,29	48,8	
@@	VAL	433	11,51	11,51	0,00	11,51	9,4	d
##	GLY	434	0,14	0,02	0,14	0,00	0,2	d
	SER	435	57,78	16,10	14,45	43,33	56,0	f
	LYS	436	85,65	58,15	10,32	75,33	45,8	
##	CYS	437	0,35	0,35	0,00	0,35	0,3	d

ES 2 678 144 T3

		Resto	Total	Apolar	Estructura	Cadena lateral	Relación (%)	Dentro/fuera
##	CYS	438	8,30	1,53	6,41	1,89	1,8	d
	LYS	439	162,28	116,42	39,17	123,11	74,8	f
	HIS	440	38,03	24,38	3,93	34,10	22,1	
@@	PRO	441	89,28	89,28	13,53	75,75	72,0	f
	GLU	442	121,29	28,48	25,71	95,58	67,7	f
	ALA	443	63,34	57,69	17,11	46,23	71,2	f
	LYS	444	132,96	87,59	1,81	131,15	79,7	f
##	ARG	445	25,14	7,16	0,00	25,14	12,9	d
	MET	446	10,99	10,94	0,05	10,94	6,9	d
	PRO	447	29,51	28,45	1,15	28,37	27,0	
##	CYS	448	28,63	21,61	16,45	12,17	11,9	d
	ALA	449	2,04	2,04	0,00	2,04	3,1	d
##	GLU	450	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	d
	ASP	451	36,51	31,08	1,41	35,10	31,1	
	TYR	452	40,33	35,83	5,38	34,95	18,1	d
##	LEU	453	14,95	14,95	0,00	14,95	10,2	d
	SER	454	11,34	10,42	2,62	8,72	11,3	d
	VAL	455	15,44	14,89	0,55	14,89	12,2	d
	VAL	456	4,31	4,31	0,71	3,60	2,9	d
@@	LEU	457	0,66	0,66	0,00	0,66	0,4	d
@@	ASN	458	0,55	0,01	0,00	0,55	0,5	d
	GLN	459	30,73	11,43	0,96	29,78	20,7	
	LEU	460	0,81	0,81	0,00	0,81	0,6	d
##	CYS	461	5,78	5,21	0,59	5,19	5,1	d
	VAL	462	12,56	11,51	1,05	11,51	9,4	d
@@	LEU	463	11,00	11,00	0,00	10,99	7,5	d
@@	HIS	464	8,67	7,03	4,93	3,74	2,4	d
	GLU	465	81,88	39,50	12,23	69,65	49,3	
@@	LYS	466	123,40	80,33	29,10	94,30	57,3	f
	THR	467	66,67	56,99	5,55	61,12	57,6	f
	PRO	468	92,50	70,96	21,54	70,96	67,5	f
@@	VAL	469	90,51	73,61	23,88	66,63	54,5	f
@@	SER	470	5,53	4,62	5,14	0,39	0,5	d
	ASP	471	122,67	42,14	3,75	118,92	100,0	f
	ARG	472	92,31	48,09	3,99	88,32	45,2	
	VAL	473	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	d
@@	THR	474	57,41	55,78	2,30	55,11	51,9	f
@@	LYS	475	131,17	87,36	4,11	127,07	77,2	f
##	CYS	476	0,27	0,00	0,00	0,27	0,3	d

ES 2 678 144 T3

		Resto	Total	Apolar	Estructura	Cadena lateral	Relación (%)	Dentro/fuera
##	CYS	477	14,41	11,81	2,60	11,81	11,5	d
	THR	478	89,89	62,73	11,19	78,69	74,1	f
	GLU	479	98,03	36,44	36,37	61,66	43,7	
@@	SER	480	18,58	18,58	4,99	13,59	17,6	d
@@	LEU	481	19,63	15,94	3,69	15,94	10,9	d
	VAL	482	11,85	10,99	0,87	10,99	9,0	d
##	ASN	483	39,73	8,35	0,00	39,73	34,8	
	ARG	484	11,05	4,76	0,00	11,05	5,7	d
##	ARG	485	5,72	5,41	0,30	5,41	2,8	d
	PRO	486	23,90	21,92	2,55	21,35	20,3	
##	CYS	487	20,34	9,90	8,30	12,03	11,8	d
##	PHE	488	0,15	0,15	0,00	0,15	0,1	d
@@	SER	489	28,76	10,00	17,50	11,26	14,5	d
	ALA	490	84,33	64,50	32,36	51,97	80,1	f
@@	LEU	491	25,03	17,27	8,78	16,25	11,1	d
	GLU	492	127,22	68,17	2,88	124,34	88,1	f
	VAL	493	59,47	50,11	9,36	50,11	41,0	
##	ASP	494	23,97	5,10	11,99	11,99	10,6	d
@@	GLU	495	151,35	58,71	32,51	118,84	84,2	f
	THR	496	128,82	92,46	28,49	100,33	94,5	f
##	TYR	497	39,86	23,56	15,79	24,07	12,5	d
	VAL	498	127,91	120,24	7,78	120,14	98,2	f
	PRO	499	48,26	38,96	9,29	38,96	37,0	
@@	LYS	500	148,50	107,74	5,26	143,24	87,1	f
	GLU	501	137,88	67,19	7,44	130,44	92,4	f
	PHE	502	145,85	127,83	18,01	127,83	71,0	f
	ASN	503	79,74	11,97	2,89	76,85	67,2	f
	ALA	504	67,05	47,09	20,71	46,34	71,4	f
	GLU	505	112,60	25,86	4,28	108,31	76,7	f
	THR	506	61,97	54,22	17,79	44,18	41,6	
##	PHE	507	39,42	28,99	10,43	28,99	16,1	d
@@	THR	508	34,75	25,10	10,55	24,20	22,8	
##	PHE	509	7,64	6,14	3,09	4,55	2,5	d
@@	HIS	510	92,59	80,12	2,75	89,84	58,1	f
	ALA	511	33,98	30,78	3,23	30,75	47,4	
	ASP	512	79,47	46,67	5,24	74,23	65,7	f
	ILE	513	0,51	0,51	0,00	0,51	0,3	d
##	CYS	514	42,31	19,66	23,41	18,90	18,5	d
@@	THR	515	123,18	80,99	37,55	85,63	80,6	f

ES 2 678 144 T3

		Resto	Total	Apolar	Estructura	Cadena lateral	Relación (%)	Dentro/fuera
@@	LEU	516	48,28	43,20	7,83	40,45	27,7	
	SER	517	54,47	51,13	20,10	34,38	44,4	
	GLU	518	100,49	23,48	2,18	98,32	69,6	f
	LYS	519	138,34	93,44	0,25	138,09	83,9	f
	GLU	520	74,95	33,52	2,44	72,51	51,3	f
	ARG	521	42,31	11,10	0,00	42,31	21,6	
	GLN	522	24,47	0,98	0,00	24,47	17,0	d
	ILE	523	63,17	63,17	0,00	63,17	42,9	
@@	LYS	524	86,04	57,44	1,03	85,01	51,7	f
@@	LYS	525	8,72	0,27	0,00	8,72	5,3	d
@@	GLN	526	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	d
	THR	527	44,15	37,83	0,00	44,15	41,6	
@@	ALA	528	2,30	2,30	0,31	2,00	3,1	d
##	LEU	529	1,24	1,24	0,00	1,24	0,8	d
	VAL	530	0,18	0,18	0,17	0,02	0,0	d
@@	GLU	531	33,31	0,91	0,00	33,31	23,6	
	LEU	532	40,59	40,59	0,00	40,59	27,8	
	VAL	533	0,62	0,62	0,02	0,60	0,5	d
##	LYS	534	22,23	12,56	0,05	22,18	13,5	d
@@	HIS	535	16,21	12,70	3,51	12,70	8,2	d
	LYS	536	125,97	80,88	1,15	124,82	75,9	f
##	PRO	537	27,87	20,96	6,91	20,96	19,9	d
	LYS	538	175,55	132,98	24,90	150,65	91,6	f
@@	ALA	539	56,44	54,45	12,79	43,65	67,3	f
##	THR	540	13,80	0,29	13,29	0,51	0,5	d
	LYS	541	151,76	134,73	10,81	140,96	85,7	f
	GLU	542	143,28	57,29	0,82	142,46	100,0	f
	GLN	543	94,49	50,37	5,53	88,96	61,9	f
@@	LEU	544	7,38	7,00	0,39	6,99	4,8	d
	LYS	545	122,91	82,05	5,96	116,95	71,1	f
	ALA	546	52,65	52,51	2,40	50,25	77,4	f
@@	VAL	547	37,83	37,83	0,46	37,37	30,6	
	MET	548	7,10	7,09	0,01	7,09	4,5	d
	ASP	549	79,72	33,37	9,30	70,42	62,3	f
	ASP	550	81,72	24,24	6,19	75,53	66,8	f
##	PHE	551	16,40	16,40	0,00	16,40	9,1	d
	ALA	552	26,97	15,46	11,51	15,46	23,8	
	ALA	553	46,71	43,76	6,20	40,51	62,4	f
	PHE	554	31,60	31,60	0,92	30,68	17,0	d

	Resto	Total	Apolar	Estructura	Cadena lateral	Relación (%)	Dentro/fuera	
	VAL	555	1,51	1,51	0,00	1,51	1,2	d
	GLU	556	87,68	24,41	9,37	78,31	55,5	f
	LYS	557	108,24	67,45	6,00	102,25	62,2	f
##	CYS	558	0,47	0,00	0,47	0,00	0,0	d
##	CYS	559	40,50	20,21	20,91	19,58	19,1	d
	LYS	560	171,40	121,84	23,55	147,84	89,9	f
	ALA	561	40,51	22,45	32,45	8,06	12,4	d
	ASP	562	140,81	38,02	34,22	106,59	94,3	f
	ASP	563	89,28	21,77	5,33	83,95	74,3	f
	LYS	564	179,18	123,99	17,96	161,22	98,0	f
	GLU	565	81,62	24,70	3,45	78,18	55,4	f
	THR	566	65,21	52,57	9,24	55,97	52,7	f
##	CYS	567	18,00	6,61	2,26	15,75	15,4	d
##	PHE	568	7,30	5,31	1,99	5,31	2,9	d
	ALA	569	69,77	60,43	19,45	50,32	77,5	f
	GLU	570	122,28	62,01	33,64	88,64	62,8	f
	GLU	571	91,89	17,51	27,02	64,87	45,9	
##	GLY	572	80,42	41,46	80,42	0,00	92,2	f

6.10 Ejemplo 10: Mutagénesis en cada resto del dominio III a todos los posibles aminoácidos para crear una colección de mutantes de aminoácidos individuales

5 Cada aminoácido del dominio III, con la excepción de cisteínas y prolinas, se muta a todos los 20 aminoácidos (es decir, el aminoácido de tipo silvestre y los 19 aminoácidos que no son de tipo silvestre) para crear una colección de mutantes de modo que cada mutante individual tenga una única mutación en únicamente una posición. La longitud completa de 205 aminoácidos se cubre en la construcción de la colección; por consiguiente se mutan 184 restos individualmente lo que produce una diversidad de colección total de 3496. Las mutaciones del dominio III se introducen y criban en el contexto de uno o más de los siguientes: dominio III en solitario, proteína SAH completa, SAH truncada o una proteína quimérica que comprende al menos el dominio III. Pueden utilizarse métodos convencionales de mutagénesis para generar una colección de mutantes del dominio III. Opcionalmente o como alternativa la colección de mutantes del dominio III se genera por una instalación comercial tal como Geneart AG, Alemania. La colección de mutantes se clona en un vector de presentación tal como el vector de presentación en levadura pYD1 o el vector de presentación en mamífero pEN-HSA-GPI descrito anteriormente, que comprende una secuencia OriP para la generación potenciada de adenovirus recombinante (véase, la figura 10 para un esquema de un vector de entrada genérico que comprende un OriP) y se criban para la capacidad de unión a FcRn usando ensayos *in vitro* convencionales descrito en la solicitud (por ejemplo, citometría de flujo). Se identifican una o más variantes que presentan afinidad mejorada por FcRn. Cada variante también se puede cribar para determinar si la afinidad mejorada por FcRn se produce únicamente a pH ácido, pero no a pH neutro. La afinidad mejorada por FcRn a pH ácido, pero no a pH neutro se ensaya para (i) construcciones del dominio III variante en solitario; (ii) construcciones del dominio III variante presentadas en el contexto de SAH de longitud completa; o (iii) en el contexto de un polipéptido quimérico. Lo anterior se compara con el dominio III de tipo silvestre, SAH de longitud completa de tipo silvestre o el polipéptido quimérico sin las mutaciones. El diseño experimental permite la identificación del epitopo de unión, junto con una o más mutaciones que mejoran la afinidad por FcRn.

Se generó una colección sintética del dominio III (DIII) como se describe anteriormente que tiene 6x10⁴ transformantes independientes. Aunque la colección se diseñó de modo que cada mutante individual tuviera una única mutación en únicamente una posición, se generaron varias mutaciones dobles e incluso triples. La colección sintética DIII se amplificó por PCR y se ensambló con DI y DII para formar colecciones de SAH de longitud completa por PCR solapante. La PCR se digirió con Sfi I y EcoR I y se clonó en el vector pEN-HSA-GPI, digerido de forma similar, un vector de entrada Gateway™ de presentación en mamífero potenciado que comprende una secuencia OriP como se describe anteriormente (véanse, por ejemplo, las figuras 8B y 10). Los cebadores usados para amplificar la colección DIII tiene seis (6) restos de aminoácido de tipo silvestre en los extremos N y C, por

consiguiente, se eliminó la diversidad en estos 12 aminoácidos del dominio III. Se generaron dos colecciones en el vector pEN-HSA-GPI y se generaron las correspondientes colecciones adenovíricas esencialmente como se describe anteriormente excepto que se usaron 12 µg del vector de expresión adenovírico linealizado PAC I para la generación de la colección. El tamaño de cada colección se muestra en la tabla 4. Se examinó la diversidad de las colecciones de pEN-HSA-GPI, en la colección 1: ~50 % de los clones eran de tipo silvestre, mientras que en la colección 2: ~30 % de los clones eran de tipo silvestre.

Tabla 4: Tamaño de la colección DIII

	pEN-HSA	pAd-HSA
colección 1	1,3 x 10 ⁶	5,4 x 10 ⁶
colección 2	6,4 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁷

Se teñieron células infectadas con adenovirus que expresa SAH de tipo silvestre, la colección 1 de SAH-DIII o la colección 2 de SAH-DIII con anticuerpo anti-SAH-FITC y FcRn biotina (detectado con SA-PE) esencialmente como se describe en el ejemplo 5 anterior y se analizaron/cribaron por FACS como se describe a continuación. Los niveles de expresión de la SAH de tipo silvestre y las dos colecciones fueron comparables (figura 12A). Únicamente la población celular que expresa las colecciones de SAH-DIII mostraron un desplazamiento en el histograma cuando se teñían con 10 µg/ml de FcRn (figura 12B). La figura 13 muestra los perfiles FACS de doble tinción correspondientes.

Las poblaciones celulares enriquecidas se recuperaron de la clasificación, se amplificaron y se sometieron a una segunda ronda de enriquecimiento por clasificación o se usaron para aislar clones individuales como se describe a continuación. Como puede observarse de los histogramas de la figura 14A, los niveles de expresión de SAH de tipo silvestre, la colección de partida y las colecciones clasificadas son comparables. Sin embargo, la tinción con FcRn muestra que las colecciones clasificadas de la ronda 1 y 2 se han enriquecido para células que expresan mutantes de SAH-DIII que pueden unirse a FcRn presente a bajas concentraciones, 1 µg/ml e incluso 0,1 µg/ml (figuras 14B y C).

Se aislaron varios clones individuales (como se describe a continuación) y se cribaron para la unión a FcRn dependiente del pH esencialmente como se describe en el ejemplo 2 anterior excepto en que el experimento se realizó a pH 7,2. La figura 15 muestra histogramas representativos para las células de control, SAH de tipo silvestre y varios clones de representativos a pH 5,5 (panel A) y pH 7,2 (panel B). Los niveles de expresión entre estos mutantes de SAH y SAH de tipo silvestre son comparables (figura 15C). Como se muestra en la figura 16, los clones identificados que retienen la unión dependiente del pH (es decir, unión preferente a pH bajo) se secuencian y pueden someterse a análisis FACS adicional usando varias concentraciones de FcRn (por ejemplo, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml y 10 µg/ml de FcRn-biotina) junto con SAH de tipo silvestre y células de control para analizar la afinidad relativa de las mutaciones por FcRn. Se secuenciaron ~1100 clones adicionales de la población enriquecida antes de cualquier otra caracterización. La tabla 5 proporciona un resumen de las sustituciones de aminoácido identificadas en los clones aislados y/o secuenciados de las colecciones. Las posiciones en negrita indican que se encontraron sustituciones en esa posición entre aproximadamente un 1-5 % de los clones y pueden mencionarse como "puntos preferidos". Las posiciones en negrita y subrayadas indican que se encontraron sustituciones en esa posición en más de un 5 % de los clones y pueden mencionarse como "puntos calientes". Las sustituciones de aminoácido (columna AA sustituido) enumeradas en cursiva se identificaron únicamente en el contexto de una mutación doble/triple. Las sustituciones de aminoácido (columna AA sustituido) encontradas en 5 o más clones se muestran en negrita. Las combinaciones encontradas en tres o más clones también se muestran en negrita con la cantidad de clones identificados mostrada en paréntesis. La numeración de los aminoácidos es respecto a la SAH de longitud completa madura proporcionada en la SEQ ID NO: 2. Se aislaron múltiples clones que contenían la misma sustitución de aminoácido en la misma posición y/o sustituciones de aminoácido diferentes en la misma posición (véase la tabla 5), que indica que estas posiciones pueden representar puntos calientes de mutación.

La ubicación de varios de los puntos preferidos y/o calientes en la estructura resuelta de SAH se indican en la figura 17. La mayoría de los puntos calientes y los puntos preferidos, excepto los aminoácidos 407, 415 y 463, se encuentran en los bucles 6 y 7 (que abarcan los restos 492-509 y 516-518, respectivamente) y las hélices 7 y (abarcando los restos 510-515 y 519-536, respectivamente), rodeados por un círculo en la figura 16.

Tabla 5 Resumen de mutaciones de DIII identificadas

Posición*	AA sustituido*	Combinaciones*
V381	D2; N1	V381D/T506R/Q522R
E382	ninguno	
E383	A1; G1	E383G/K413S
P384	A1; S2	P384A/L463N; P384S/Q459A

ES 2 678 144 T3

Posición*	AA sustituido*	Combinaciones*
Q385	E1; L4	Q385E/Q526H; Q385L/R472W; Q385L/T412G; Q385L/S454C; Q385L/L463N
N386	S1	N386S/I523T
L387	ninguno	
I388	ninguno	
K389	G1; M1	K389M/406P/408E
Q390	ninguno	
N391	E2; L1; T1; V2	N391T/D549L
C392	ninguno	
E393	C2; V2	E393V/K524L; E393V/Q522H
L394	ninguno	
F395	K1	F395K/K414N
E396	K1	E396K/I523H
Q397	G1	Q397G/L463N
L398	K3	L398K/L463F/K524H; L398K/K524H
G399	ninguno	
E400	//	E400I/I523T
Y401	E1; K1; Q2; V1	Y401E/I523G; Y401K/F488Y/L516F; Y401V/F509G
K402	A1; D1; W2	
F403	L1; N1; V1; W1	F403L/V426N/T515G; F403N/I523G; F403V/A443P
Q404	H1; N1; M1; T1; W2	Q404N/K524L; Q404M/K525E
N405	E1; T5	N405T/T508R; N405T/E495D/H510P; N405T/K524L; N405T/E495D; N405T/L516C
A406	K1; M1; P1	K389M/406P/408E
L407	H2; M1; N6; Y6; R1	L407N/P447S (3 Ω); L407N/P447S/A539I (3); L407Y/F509M (5); L407Y/Q526T; L407R/V555P
L408	E2; F1; R1	K389M/406P/408E
V409	P1; W1	
R410	K1; L2;	R410L/E495D
Y411	A1; F1; H1; L3; Q3; R1	Y411A/455E; Y411H/I523L; Y411L/L463N/T508R; Y411L/I523Q (2); Y411Q/H535N (3); Y411R/I523M
T412	G1; L1; R1; S1; W1	Q385L/T412G; T412R/K534G; T412L/E479Q/I523A
K413	S1	E383G/K413S
K414	N1; Q1; S3; Y1	K414S/V456N (3); K414Y/E465W; F395K/K414N
V415	C1; L1; T11	V415L/T467N; V415T/A569P; V415T/571K
P416	P1	
Q417	P1	Q417P/I523D
V418	K1; L1	
S419	M1; P1	S419M/K524L
T420	K1; S1	
P421	ninguno	

ES 2 678 144 T3

Posición*	AA sustituido*	Combinaciones*
T422	ninguno	
L423	H1; N1; R2; Y1	L423N/I523D; L423R/A443D (2)
V424	D1; I5; M2; Q4; W1	V424D/E505H; V424I/L463F; V424M/E531I
E425	K3	
V426	E4; F1; H3; L1; N2; Q1	F403L/V426N/T515G; V426E/K524L; V426H/Q526Y (2); V426L/E495D/Q526Y; V426N/T515G; V426Q/D512M/E520N
S427	ninguno	
R428	E1; F2	R428E/T506M/L516I
N429	W1	
L430	ninguno	
G431	F1; M2	G431F/L516T/E520Y
K432	C1	
V433	G1; T2	V433T/L463N/T508R; V433T/T508R
G434	C1; K1	
S435	ninguno	
K436	P2	K436P/I523G
C437	ninguno	
C438	ninguno	
K439	ninguno	
H440	F1; R2	H440F/F488G
P441	ninguno	
E442	K1	E442K/E450D/Q459R
A443	P2; D2	F403V/A443P; L423R/A443D (2)
K444	S1; Q1	K444S/D549L; K444Q/E465G
R445	D2; W1; Y1	R445D/I523C; R445D/N503T; R445Y/K519I/K525V
M446	T1; W3	M446W/H535P; M446T/T515Y
P447	S7	L407N/P447S (3Q); L407N/P447S/A539I (3); P447S/A539V;
C448	ninguno	
A449	ninguno	
E450	D1	E442K/E450D/Q459R
D451	ninguno	
Y452	R1	
L453	ninguno	
S454	C4; E2; K1	Q385L/S454C; S454C/A539R
V455	D1; E1; G1; I1; N6	Y411A/455E; 455N/K524L
V456	A1; E3; F1; L2; N5;	K414S/V456N (3); V456A/E518Y; V456E/L516W; V456E/R521W; V456N/R472S/F509M (2)
L457	F1; I1;	
N458	ninguno	

ES 2 678 144 T3

Posición*	AA sustituido*	Combinaciones*
Q459	A1; P1; R1	P384S/Q459A; E442K/E450D/Q459R
L460	N1	L460N/K524L
C461	ninguno	
V462	ninguno	
L463	F3; G1; I1; N~230†; S2	P384A/L463N; Q385L/L463N; Q397G/L463N; L398K/L463F/K524H; V424I/L463F; L463F/E505I; L463N/T506N; L463N/T506Y; L463N/T508S (2); L463N/T508Rr (~190€); L463G/D512Y; L463N/D512Y; L463I/S517W; L463N/Q526M (2); L463N/K534M;
H464	E2; V1	H464V/T474N
E465	G1; W2	K414Y/E465W; K444Q/E465G
K466	W3	K466W/S517W;
T467	N1; P1; W1	V415L/T467N;
P468	ninguno	
V469	ninguno	
S470	ninguno	
D471	N1	D471N/R521Q
R472	D1; R1; S2; W1	Q385L/R472W; V456N/R472S/F509M (2); R472D/I523G; R472R/Q522D
V473	E1; L2	V473L/S517W (2)
T474	N2; Q1	H464V/T474N
K475	LL	
C476	ninguno	
C477	ninguno	
T478	ninguno	
E479	Q1	T412L/E479Q/I523A
S480	ninguno	
L481	ninguno	
V482	E1; I1	V482E/I523R; V482I/I523K
N483	K1	N483K/K524L
R484	ninguno	
R485	P1	R485P/N503V
P486	ninguno	
C487	ninguno	
F488	G1; Y1	Y401K/F488Y/L516F; H440F/F488G
S489	ninguno	
A490	ninguno	
L491	ninguno	
E492	ninguno	
V493	ninguno	
D494	ninguno	

ES 2 678 144 T3

Posición*	AA sustituido*	Combinaciones*
E495	D9	N405T/E495D/H510P; N405T/E495D; R410L/E495D; V426L/E495D/Q526Y; L463N/E495D/T508R (2); E495D/Q526Y
T496	ninguno	
Y497	ninguno	
V498	M1	
P499	ninguno	
K500	ninguno	
E501	ninguno	
F502	ninguno	
N503	T1; V2	R445D/N503T; R485P/N503V; N503V/A539R
A504	ninguno	
E505	H1; I5	V424D/E505H; L463F/E505I
T506	M1; N1; R2; W1; Y6	V381D/T506R/Q522R; R428E/T506M/L516I; L463N/T506N; L463N/T506Y; T506R/Q522C; T506Y/C559R
F507	V1; W1	F507W/I523F
T508	R~200; S3	N405T/T508R; V433T/T508R; L463N/T508Rr (~190¥); L463N/T508S (2); Y401V/F509G; L407Y/F509M (5); F509W/K557G; 456N/R472S/F509M (2); F509I/T527Y (4);
F509	D2; G1; I4; M12; P1; W6	
H510	C5; P3; Q2; R1	N405T/E495D/H510P; H510C/H535L; H510R/K557G
A511	D1; F9; I1; R1; T1; V1; Y1	A511F/Q526P; A511I/K538W; A511V/H535S/K541T; A511Y/V555E;
D512	F1; M2; Q1; Y13	V426Q/D512M/E520N; L463G/D512Y; L463N/D512Y; D512M/E520N
I513	T1; Q1;	I513Q/I523Y
C514	Y1	
T515	C3; D2; E2; G1; H2; L2; N1; P2; Q11; S4; W2; Y2	326N/T515G; F403L/V426N/T515G; M446T/T515Y; T515W/Q522K; T515P/I523R; T515L/M548F; T515N/D549S;
L516	C2; F3; G1; I1; T6; W6; Y1	Y401K/F488Y/L516F; N405T/L516C; R428E/T506M/L516I; G431F/L516T/E520Y; V456E/L516W; L516W/A539V; L516W/Q543W;
S517	C1, W7	L463I/S517W; K466W/S517W; V473L/S517W (2)
E518	A2; V1; Y1	V456A/E518Y;
K519	C3; D2; E1; I3	R445Y/K519I/K525V; T508R/K519I/K525V
E520	C1; N2; V1; W2; Y1	V426Q/D512M/E520N; G431F/L516T/E520Y; D512M/E520N
R521	H1; M1; Q1; T1; W18; Y1	V456E/R521W; D471N/R521Q; R521M/D563F
Q522	C1; D1; H1; K1; R2; W1; Y2	V381D/T506R/Q522R; E393V/Q522H; R472R/Q522D; T506R/Q522C; T515W/Q522K;
I523	A2; C1; D13; E8; F4; G31; H3; K13; L1; M1; P1; Q4; R11; S2; T3; W2; Y2F	N386S/I523T; E396K/I523H; E400I/I523T; F403N/I523G; Y411H/I523L; Y411L/I523Q (2); Y411R/I523M; T412L/E479Q/I523A; 416P/I523D; Q417P/I523D; L423N/I523D; K436P/I523G; R445D/I523C; R472D/I523G; V482E/I523R; V482I/I523K; F507W/I523F; I513Q/I523Y; T515P/I523R; I523Q/K538Y
K524	H3; I2; L68; M2; Q3; V4	E393V/K524L; L398K/L463F/K524H; L398K/K524H; Q404N/K524L; N405T/K524L; S419M/K524L; V426E/K524L; 455N/K524L; L460N/K524L; N483K/K524L; K524L/T540I/571K; K524Q/K545M;
K525	E1; V3	Q404M/K525E; R445Y/K519I/K525V; T508R/K519I/K525V
Q526	A4; F1; H1; L1; M10; P1; T1; V1; Y4	Q385E/Q526H; V426H/Q526Y (2); V426L/E495D/Q526Y; L407Y/Q526T; L463N/Q526M (2); E495D/Q526Y; A511F/Q526P; Q526M/K557G
T527	E1; V1; Y7	F509I/T527Y (4);

ES 2 678 144 T3

Posición*	AA sustituido*	Combinaciones*
A528	G1; N1;	
L529	F1	
V530	E1; 11;	
E531	G1; I2; P1;	V424M/E531I;
L532	V2;	
V533	S1	
K534	G1; M1	T412R/K534G; L463N/K534M
H535	D1; K1; L1; N3; P5; S2	Y411Q/H535N (3); M446W/H535P; H510C/H535L; A511V/H535S/K541T;
K536	L1; R1; T1	
P537	ninguno	
K538	C1; D2; W1; Y1	A511I/K538W; I523Q/K538Y
A539	I3; N1; R1; V2	L407N/P447S/A539I (3); P447S/A539V; P447S/A539I (3); S454C/A539R; N503V/A539R; L516W/A539V
T540	I1; K1	K524L/T540I/E571K;
K541	P1; T2; F2	A511V/H535S/K541T; K541F/A561F
E542	W1	
Q543	P1; W1	L516W/Q543W
L544	M1	
K545	M1; N1	K524Q/K545M;
A546	I1; D1	
V547	ninguno	
M548	F2	T515L/M548F;
D549	A1; L3; S2	N391T/D549L; K444S/D549L; T515N/D549S
D550	ninguno	
F551	ninguno	
A552	P2	
A553	ninguno	
F554	P2	
V555	D1; E1; P2	L407RN555P; A511Y/V555E
E556	ninguno	
K557	G11; N1; S1	F509W/K557G; H510R/K557G; Q526M/K557G
C558	ninguno	
C559	R1	T506Y/C559R
K560	Q1	
A561	F2; T1	K541F/A561F
D562	V1; S1	
D563	A1; Y1; M1; F1	R521M/D563F
K564	I1; R2	

Posición*	AA sustituido*	Combinaciones*
E565	K1; Y5; W1	L463N/T508R/E565Y;
T566	K1; W1	
C567	ninguno	
F568	I3; T1	
A569	H2; P2; Y1	V415T/A569P
E570	ninguno	
E571	K5; D1	V415T/571K; K524L/T540I/E571K
G572	E1; R2; Y1	
K573	A1	
K574	ninguno	
L575	M1; Y1	
V576	D2	
A577	ninguno	
A578	T1; V2	
S579	ninguno	
Q580	ninguno	
A581	ninguno	
A582	D2; T2	
L583	ninguno	
G584	ninguno	
L585	ninguno	

* Numerado con respecto a SAH de longitud completa madura (SEQ ID NO: 2); el resto de aminoácido sustituido está seguido por un número que indica el número de veces que se encontró el resto; las combinaciones se enumeran en general en la fila para cada posición encontrada en la secuencia Ω de combinación no definitiva en la posición 407 de dos de los tres clones
† L463N identificado por primera vez como clon 12
€ L463N/T508R identificado por primera vez como clon 45
¥ ocasionalmente con una tercera sustitución (por ejemplo, Y411L, V433T, E495D, A504G, E531G, 571K)
‡ estos clones también pueden tener una eliminación en 523
£ I523Y identificado por primera vez como clon 46

5 Se generaron varios mutantes así identificados como proteína soluble por mutagénesis dirigida al sitio y se purificaron como se describe a continuación para análisis adicional. Se determinaron la afinidad de unión (K_D a pH 5,5) y la dependencia del pH (7,2 frente a 5,5) por ProteOn (que se describe a continuación) y/o BIAcore (esencialmente como se describe anteriormente). La tabla 6 proporciona un resumen de los estudios de unión e incluye las densidades de proteína para estos estudios. Se encontró que varios mutantes tenían unión potenciada a pH 5,5, incluyendo L407Y/Q526T; L463N/T508R; I523G; V424Q; L83N/128R/I143G; y K144, en negrita en la tabla 6.

10 De los ensayos, todos los que mostraron unión potenciada a pH 5,5 también se encontró que mantenían la unión dependiente del pH (véase la última columna de la tabla 6). Se encontró que varios mutantes ensayados tenían K_D inalterada o incluso aumentada (es decir, unión inalterada o peor) a pH 5,5. Hay varias razones posibles por las que dichos clones pueden haberse identificado, por ejemplo, estas mutaciones pueden potenciar la expresión de proteína o estabilidad en el sistema de presentación. También es posible que el anclaje de GPI usado para la presentación pueda tener algún impacto sobre la unión que estos mutantes puedan compensar y por eso no se
15 duplica cuando la SAH mutante se expresa como molécula soluble. Además, el diseño de la metodología de cribado optimizada para capturar la tasa de inactivación estabilizó los mutantes, lo que puede traducirse o no en una mejora de afinidad global. También puede reflejar que estas mutaciones proporcionan potenciación cuando están en combinación con una o más mutaciones diferentes. Se encontraron varias mutaciones en combinaciones (véase la tabla 5).

Tabla 6 Resumen de estudios de unión

huFcRn frente a	K _D (μM)-ProteOn	Densidad superficial (UR)	Dependencia del pH
WT	2,83	1880	Y
L407Y/Q526T	0,191	3940	Y
L463N/T508R	0,105	3950	Y
F509W	nb	4920	
A511I	nb	3720	
K519E	nb	3260	
R521W	3,13	3940	
I523G	0,074	3740	Y
huFcRn frente a	K _D (μM)-BIAcore	Densidad superficial (UR)	Dependencia del pH
WT	0,91	2952	Y
V424Q	0,46	3441	Y
V426E	2,50	7279	Y
V426H	3,59	6665	
L463N/T508R/I523G	~0,184**	6427	
F509M	~27,4*	7337	
A511F	1,48	3395	Y
D512Y	1,00	3355	Y
T515S	2,88	3522	N
L516T	5,02	6780	
S517W	0,69	3144	
K524L	~0,360**	6388	
El blanco indica no ensayado; nb indica sin unión en las condiciones usadas			
* Estimación - afinidad débil + concentración superior a 10 μM produjo únicamente una curvatura marginal para la isoterma Req frente a Conc.			
* Estimación - fuerte afinidad - unión de curvas de concentración inferior no alcanzaron equilibrio "verdadero"			

Tinción celular y análisis FACS y clasificación: Se infectaron 30 millones de células 293F a una densidad de 1×10^6 /ml con la colección adenovírica de SAH a MOI=1. Las células se recogieron 16 horas después de la transducción por centrifugación, se lavaron con tampón FACS frío y se resuspendieron a $\sim 1 \times 10^7$ células/ml. Se añadió FcRn biotinilado a 10 μg/ml (212 nM) para la 1.ª ronda de clasificación. Después de incubación a 4 °C durante 60 min, las células se lavaron dos veces con tampón FACS y se resuspendieron en Estreptavidina-PE a diluciones de 1:500. Después de incubación a 4 °C durante 30 min y lavado una vez con tampón FACS y clasificación para la unión a FcRn, esto enriquece aquellas células que se unen a FcRn a pH 5,5. Las células clasificadas se amplificaron para cribado adicional. Para la 2.ª ronda de clasificación la población de células enriquecidas se clasificó esencialmente como se describe anteriormente excepto en que se usó FcRn biotinilado a 1 μg/ml (21,2 nM) para enriquecer adicionalmente los mutantes de SAH de alta afinidad. El análisis adicional de las colecciones enriquecidas también se realizó a 0,1 μg/ml (2,12 nM), véase, por ejemplo, la figura 14. En algunos cribados se incorporó una etapa de "deselección" en la 1.ª y 2.ª ronda de cribado en que las poblaciones enriquecidas de células se clasificaron para eliminar aquellas que se unían a FcRn a pH neutro (pH 7,4). Para identificar los clones individuales, se extrajo el ADN vírico de la población de células enriquecidas y las variantes de DIII de SAH se clonaron en un vector de expresión de mamífero para la transfección transitoria de células 293F. Los clones individuales se cribaron para la unión dependiente del pH por citometría de flujo a pH 5,5 y pH 7,4 esencialmente como se describe anteriormente.

Generación y expresión de mutantes de SAH-DIII: Se muta SAH de tipo silvestre para generar varios mutantes de DIII usando protocolos convencionales (QuikChange® II XL kit de mutagénesis dirigida al sitio, Agilent n.º de Catálogo 200521) en un vector de expresión de mamífero usando cebadores mutagénicos específicos. Los mutantes

se expresan en células 293F por transfección transitoria con reactivo de transfección 293fectin™ (Invitrogen, n.º de Catálogo Sku12347-019) según el protocolo del fabricante y los mutantes se purificaron en gel de afinidad ANTI-FLAG M2 (Sigma-Aldrich n.º de Catálogo A2220) usando procedimientos convencionales. Todos los mutantes así purificados se analizaron por SDS-PAGE y cromatografía por exclusión de tamaño para evaluar la pureza y la agregación. Todos los mutantes se consideraron un ~99 % puros sin agregación significativa (más de un 95 % monoméricos) (datos no mostrados).

Análisis ProteOn: Se midió la afinidad (KD) de FcRn humano por las variantes de SAH en un sistema de micromatriz de interacción de proteínas ProteOn XPR36 (BioRad). En resumen, las variantes de SAH se inmovilizaron a alta densidad en superficies de flujo separadas en un chip detector ProteOn GLM, usando el kit de acoplamiento de amina ProteOn como se indica por el fabricante. Las densidades de SAH superficiales finales eran entre 3740-3950 UR. También se preparó una superficie de flujo de referencia en el chip sin ninguna proteína usando el protocolo de inmovilización idéntico. Se inyectaron diluciones en serie de factor de FcRn humano, que varían de 5,86 nM a 10 000 nM, en PO4 50 mM, tampón NaCl 150 mM a pH 5,5 sobre las superficies acopladas a proteína y las superficies de células de referencia a un caudal de 25 µl/min. Se recogieron los datos de unión durante 8 min, seguido por regeneración con múltiples inyecciones de 60 s de solución salina tamponada con fosfato pH 7,4 que contenía Tween20 al 0,05 %. La respuesta de unión en equilibrio (Req) para cada inyección se representó frente a la concentración y se ajustó a un modelo de afinidad en equilibrio, usando el programa informático ProteOn Manager para obtener la constante de unión en equilibrio KD.

Basándose en este análisis, se realiza un análisis adicional de las mutaciones de combinación identificadas para evaluar la actividad de cada mutación individual. Adicionalmente, se realiza un cribado adicional para identificar si diferentes combinaciones de mutaciones (por ejemplo, construcciones que tienen mutaciones en más de una posición que no se identificaron directamente en el cribado) proporcionan afinidad mejorada por FcRn.

6.11 Ejemplo 11: Mutagénesis de combinación de restos seleccionados en el dominio III

Para examinar las combinaciones de las mutaciones más frecuentes identificadas en el ejemplo 10 (anterior) se genera una colección sintética del dominio III de modo que los restos: 407; 415; 463; 495; 508; 509; 511; 512; 515; 516; 517; 521; 523; 524; 526; 527; y 557, se muten en los restos indicados en la tabla 7 para crear una colección de mutantes de modo que cada mutante individual tenga 2-4 mutaciones. Como alternativa, la colección puede generarse de modo que cada uno de los restos enumerados se mute en todos los 20 aminoácidos (es decir, el aminoácido de tipo silvestre y los 19 aminoácidos que no son de tipo silvestre) para examinar un conjunto más amplio de combinaciones.

Las mutaciones de combinación del dominio III se introducen y criban en el contexto de uno o más de los siguientes: dominio III en solitario, proteína SAH completa, SAH truncada o una proteína quimérica que comprende al menos el dominio III. Pueden utilizarse métodos convencionales de mutagénesis para generar una colección de mutantes del dominio III. Opcionalmente o como alternativa la colección de mutantes del dominio III se genera por una instalación comercial tal como Genearth AG, Alemania.

La colección de mutantes de combinación se clona en un vector de presentación tal como el vector de presentación en levadura pYD1 o el vector de presentación en mamífero pEN-HSA-GPI descrito anteriormente y se criban para la capacidad de unión a FcRn usando ensayos *in vitro* convencionales descrito en la solicitud (por ejemplo, citometría de flujo). Pueden emplearse métodos de selección positiva y/o negativa, tales como los descritos en el ejemplo 10.

Se identifica una o más variantes de combinación que presentan afinidad mejorada por FcRn. Cada variante de combinación también puede cribarse para determinar si la afinidad mejorada por FcRn se produce únicamente a pH ácido, pero no a pH neutro. La afinidad mejorada por FcRn a pH ácido, pero no a pH neutro se ensaya para (i) construcciones del dominio III variante en solitario; (ii) construcciones del dominio III variante presentadas en el contexto de SAH de longitud completa; o (iii) en el contexto de un polipéptido quimérico. Lo anterior puede compararse con el dominio III de tipo silvestre, SAH de longitud completa de tipo silvestre o un polipéptido quimérico sin las mutaciones. Como alternativa, u opcionalmente, las mutaciones de combinación pueden compararse con el dominio III, SAH de longitud completa o un polipéptido quimérico que comprende cada mutación individualmente para determinar si la combinación potencia adicionalmente la afinidad por FcRn y/o la semivida en suero. El diseño experimental permite la identificación de mutaciones de combinación que mejoran la afinidad por FcRn y/o mejoran la semivida en suero.

Tabla 7 Mutaciones para una colección de combinación

Posición	Mutación	Posición	Mutación	Posición	Mutación
407	N, Y	511	F	523	D, E, F, G, K, R
415	T	512	M, Y	524	L
463	F, N	515	Q	526	A, M, Y

Posición	Mutación	Posición	Mutación	Posición	Mutación
495	D	516	T, W	527	Y
508	R, S	517	W	557	G
509	I, M, W	521	W		

6.12 Ejemplo 12: Mutagénesis de restos en el dominio III para crear mutantes de un único aminoácido a cribar para afinidad por FcRn mejorada

- 5 Se seleccionan dieciocho aminoácidos individuales de aminoácidos conservados en el dominio III y se mutan individualmente en alanina de modo que cada variante tenga una única mutación en únicamente una posición usando métodos convencionales descritos en la solicitud. Las dieciocho variantes se introducen y se criban en el contexto de la proteína SAH completa, o como alternativa en una SAH truncada o proteína quimérica que comprende al menos el dominio III. Las dieciocho variantes se criban para la capacidad de unión a FcRn usando ensayos *in vitro* convencionales descrito en la solicitud. Se identifican una o más variantes que presentan afinidad mejorada por FcRn. Cada variante también se criba para determinar si la afinidad mejorada por FcRn se produce únicamente a pH ácido, pero no a pH neutro. La afinidad mejorada por FcRn a pH ácido, pero no a pH neutro se ensaya para (i) construcciones del dominio III variante en solitario; (ii) construcciones del dominio III variante presentadas en el contexto de SAH de longitud completa; o en el contexto de un polipéptido quimérico. Lo anterior se compara con el dominio III de tipo silvestre, SAH de longitud completa de tipo silvestre o polipéptido quimérico sin mutaciones.

Basándose en este análisis, se realiza un cribado adicional para identificar si las combinaciones de mutaciones (por ejemplo, construcciones que tienen mutaciones en más de una posición) proporcionan afinidad mejorada por FcRn.

7. Secuencias

SEQ ID NO: 1 - secuencia proteínica de DIII de SAH humana

VEEPQNLIKQNCSELFQGLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKC
 CKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEV
 DETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD
 FAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

SEQ ID NO: 2 - secuencia proteínica de SAH de longitud completa humana

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVAD
 ESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQKQEPERNECFLQHKDDNPNL
 PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPPELLFFAKRYKAAFTECC
 QAADKAACLLPKLDLDEGRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRF
 KAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK
 PLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARR
 HPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNLIKQNC
 SELFQGLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAE
 DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAET
 FTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADD
 KETCFAEEGKKLVAASQAALGL

La figura 6 proporciona una alineación del dominio III de proteína seroalbúmina de diversas especies.

La secuencia de aminoácidos de tipo silvestre para el dominio III de seroalbúmina de rata se expone en la figura 6 como la SEQ ID NO: 3. La secuencia de aminoácidos de tipo silvestre para el dominio III de seroalbúmina de ratón se expone en la figura 6 como la SEQ ID NO: 4. La secuencia de aminoácidos de tipo silvestre para el dominio III de seroalbúmina de bovino se expone en la figura 6 como la SEQ ID NO: 5. La secuencia de aminoácidos de tipo silvestre para el dominio III de seroalbúmina de ser humano se expone en la figura 6 como la SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos de tipo silvestre para el dominio III de seroalbúmina de perro se expone en la figura 6 como la SEQ ID NO: 6. La secuencia de aminoácidos de tipo silvestre para el dominio III de seroalbúmina de conejo se expone en la figura 6 como la SEQ ID NO: 7. La secuencia de aminoácidos de tipo silvestre para el dominio III de seroalbúmina de cerdo se expone en la figura 6 como la SEQ ID NO: 8. La secuencia de aminoácidos de tipo silvestre para el dominio III de seroalbúmina de pollo se expone en la figura 6 como la SEQ ID NO: 9. La secuencia de aminoácidos de tipo silvestre para el dominio III de seroalbúmina de burro se expone en la figura 6 como la SEQ ID NO: 10. La secuencia de aminoácidos de tipo silvestre para el dominio III de seroalbúmina de jerbo de Mongolia se expone en la figura 6 como la SEQ ID NO: 11. La secuencia de aminoácidos de tipo silvestre para el dominio III de seroalbúmina de ovino se expone en la figura 6 como la SEQ ID NO: 12. La secuencia de aminoácidos de tipo silvestre para el dominio III de seroalbúmina de gato se expone en la figura 6 como la SEQ ID NO: 13. La secuencia de aminoácidos de tipo silvestre para el dominio III de seroalbúmina de caballo se expone en la figura 6 como la SEQ ID NO: 14.

Aunque se han analizado realizaciones específicas de la presente invención, la anterior memoria descriptiva es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones de la invención llegarán a ser evidentes para los expertos en la materia tras la revisión de esta memoria descriptiva y las siguientes reivindicaciones. El alcance completo de la invención debe determinarse por referencia a las reivindicaciones, junto con su alcance completo de equivalentes, y la memoria descriptiva, junto con dichas variaciones.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> MedImmune LLC
- <120> Composiciones relacionadas con SAH y métodos de uso
- <130> MED0554.PCT
- <150> US61/304.954
- <151> 16-02-2010
- <150> US61/364.503
- <151> 15-07-2010
- <160> 17
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 205
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 678 144 T3

Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr
 20 25 30

Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg
 35 40 45

Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys
 50 55 60

Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu
 65 70 75 80

Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys
 85 90 95

Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu
 100 105 110

Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr
 115 120 125

Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys
 130 135 140

Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr
 145 150 155 160

Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu
 165 170 175

Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly
 180 185 190

Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 195 200 205

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

5

<400> 2

ES 2 678 144 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

ES 2 678 144 T3

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

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

ES 2 678 144 T3

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

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> 205
- <212> PRT
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 3

5

ES 2 678 144 T3

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

<210> 4
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 4

ES 2 678 144 T3

Leu Val Glu Glu Pro Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys Asp Leu Tyr
 1 5 10 15

Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg Tyr
 20 25 30

Thr Gln Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala Ala
 35 40 45

Arg Asn Leu Gly Arg Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu Pro Glu Asp
 50 55 60

Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn Arg
 65 70 75 80

Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His Val Thr Lys
 85 90 95

Cys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
 100 105 110

Thr Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr Phe
 115 120 125

Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln Ile
 130 135 140

Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
 145 150 155 160

Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe Leu
 165 170 175

Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr Glu
 180 185 190

Gly Pro Asn Leu Val Thr Arg Cys Lys Asp Ala Leu Ala
 195 200 205

<210> 5
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*

5

<400> 5

ES 2 678 144 T3

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

<210> 6
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

5

<400> 6

ES 2 678 144 T3

Leu Val Asp Glu Pro Gln Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys Glu Leu Phe
 1 5 10 15

Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr
 20 25 30

Thr Lys Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser
 35 40 45

Arg Lys Leu Gly Lys Val Gly Thr Lys Cys Cys Lys Lys Pro Glu Ser
 50 55 60

Glu Arg Met Ser Cys Ala Glu Asp Phe Leu Ser Val Val Leu Asn Arg
 65 70 75 80

Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Arg Val Thr Lys
 85 90 95

Cys Cys Ser Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Gly Leu
 100 105 110

Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe
 115 120 125

Thr Phe His Ala Asp Leu Cys Thr Leu Pro Glu Ala Glu Lys Gln Val
 130 135 140

Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Leu Lys His Lys Pro Lys Ala
 145 150 155 160

Thr Asp Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Gly Asp Phe Gly Ala Phe Val
 165 170 175

Glu Lys Cys Cys Ala Ala Glu Asn Lys Glu Gly Cys Phe Ser Glu Glu
 180 185 190

Gly Pro Lys Leu Val Ala Ala Ala Gln Ala Ala Leu Val
 195 200 205

<210> 7
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

5

<400> 7

ES 2 678 144 T3

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

<210> 8
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> *Sus scrofa*

5

<400> 8

ES 2 678 144 T3

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

<210> 9
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> *Gallus gallus*
 <400> 9

5

ES 2 678 144 T3

His Ile Lys Glu Thr Gln Asp Val Val Lys Thr Asn Cys Asp Leu Leu
1 5 10 15

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

Thr Lys Lys Met Pro Gln Val Pro Thr Asp Leu Leu Leu Glu Thr Gly
35 40 45

Lys Lys Met Thr Thr Ile Gly Thr Lys Cys Cys Gln Leu Gly Glu Asp
50 55 60

Arg Arg Met Ala Cys Ser Glu Gly Tyr Leu Ser Ile Val Ile His Asp
65 70 75 80

Thr Cys Arg Lys Gln Glu Thr Thr Pro Ile Asn Asp Asn Val Ser Gln
85 90 95

Cys Cys Ser Gln Leu Tyr Ala Asn Arg Arg Pro Cys Phe Thr Ala Met
100 105 110

Gly Val Asp Thr Lys Tyr Val Pro Pro Pro Phe Asn Pro Asp Met Phe
115 120 125

Ser Phe Asp Glu Lys Leu Cys Ser Ala Pro Ala Glu Glu Arg Glu Val
130 135 140

Gly Gln Met Lys Leu Leu Ile Asn Leu Ile Lys Arg Lys Pro Gln Met
145 150 155 160

Thr Glu Glu Gln Ile Lys Thr Ile Ala Asp Gly Phe Thr Ala Met Val
165 170 175

Asp Lys Cys Cys Lys Gln Ser Asp Ile Asn Thr Cys Phe Gly Glu Glu
180 185 190

Gly Ala Asn Leu Ile Val
195

- <210> 10
- <211> 205
- <212> PRT
- <213> *Equus asinus*
- <400> 10

5

ES 2 678 144 T3

Leu Val Glu Glu Pro Lys Ser Leu Val Lys Lys Asn Cys Asp Leu Phe
1 5 10 15

Glu Glu Val Gly Glu Tyr Asp Phe Gln Asn Ala Leu Ile Val Arg Tyr
20 25 30

Thr Lys Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ile Gly
35 40 45

Arg Thr Leu Gly Lys Val Gly Ser Arg Cys Cys Lys Leu Pro Glu Ser
50 55 60

Glu Arg Leu Pro Cys Ser Glu Asn His Leu Ala Leu Ala Leu Asn Arg
65 70 75 80

Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Lys Ile Thr Lys
85 90 95

Cys Cys Thr Asp Ser Leu Ala Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
100 105 110

Glu Leu Asp Glu Gly Tyr Ile Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr Phe
115 120 125

Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Asp Glu Lys Gln Ile
130 135 140

Lys Lys Gln Ser Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
145 150 155 160

Thr Lys Glu Gln Leu Lys Thr Val Leu Gly Asn Phe Ser Ala Phe Val
165 170 175

Ala Lys Cys Cys Gly Ala Glu Asp Lys Glu Ala Cys Phe Ala Glu Glu
180 185 190

Gly Pro Lys Leu Val Ala Ser Ser Gln Leu Ala Leu Ala
195 200 205

<210> 11
<211> 198
<212> PRT
<213> *Meriones unguiculatus*

<400> 11

Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Val Lys Ser Asn Cys Glu Leu Tyr
1 5 10 15

5

10

ES 2 678 144 T3

Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Val Leu Val Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Lys Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala Ala
 35 40 45
 Arg Ser Leu Gly Arg Val Gly Thr His Cys Cys Ala Leu Pro Glu Lys
 50 55 60
 Lys Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn Arg
 65 70 75 80
 Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Gln Val Thr Lys
 85 90 95
 Cys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
 100 105 110
 Pro Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr Phe
 115 120 125
 Thr Phe His Ala Asn Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln Met
 130 135 140
 Glu Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Gln Ala
 145 150 155 160
 Thr Glu Glu Gln Leu Lys Lys Val Met Gly Asp Phe Ala Glu Phe Leu
 165 170 175
 Glu Lys Cys Cys Lys Gln Glu Asp Lys Glu Ala Cys Phe Ser Thr Glu
 180 185 190
 Gly Pro Lys Leu Val Ala
 195

<210> 12
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> *Ovis aries*
 <400> 12

5

ES 2 678 144 T3

Leu Val Asp Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Lys Asn Cys Glu Leu Phe
 1 5 10 15

 Glu Lys His Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Leu Ile Val Arg Tyr
 20 25 30

 Thr Arg Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ile Ser
 35 40 45

 Arg Ser Leu Gly Lys Val Gly Thr Lys Cys Cys Ala Lys Pro Glu Ser
 50 55 60

 Glu Arg Met Pro Cys Thr Glu Asp Tyr Leu Ser Leu Ile Leu Asn Arg
 65 70 75 80

 Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Lys Val Thr Lys
 85 90 95

 Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Asp Leu
 100 105 110

 Thr Leu Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Pro Phe Asp Glu Lys Phe Phe
 115 120 125

 Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Pro Asp Thr Glu Lys Gln Ile
 130 135 140

 Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Leu Lys His Lys Pro Lys Ala
 145 150 155 160

 Thr Asp Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Glu Asn Phe Val Ala Phe Val
 165 170 175

 Asp Lys Cys Cys Ala Ala Asp Asp Lys Glu Gly Cys Phe Val Leu Glu
 180 185 190

 Gly Pro Lys Leu Val Ala
 195

<210> 13
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> *Felis catus*

5

<400> 13

ES 2 678 144 T3

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

5

<210> 14
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> *Equus caballus*

<400> 14

ES 2 678 144 T3

Leu Val Glu Glu Pro Lys Ser Leu Val Lys Lys Asn Cys Asp Leu Phe
 1 5 10 15

Glu Glu Val Gly Glu Tyr Asp Phe Gln Asn Ala Leu Ile Val Arg Tyr
 20 25 30

Thr Lys Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ile Gly
 35 40 45

Arg Thr Leu Gly Lys Val Gly Ser Arg Cys Cys Lys Leu Pro Glu Ser
 50 55 60

Glu Arg Leu Pro Cys Ser Glu Asn His Leu Ala Leu Ala Leu Asn Arg
 65 70 75 80

Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Lys Ile Thr Lys
 85 90 95

Cys Cys Thr Asp Ser Leu Ala Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
 100 105 110

Glu Leu Asp Glu Gly Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr Phe
 115 120 125

Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Asp Glu Lys Gln Ile
 130 135 140

Lys Lys Gln Ser Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
 145 150 155 160

Thr Lys Glu Gln Leu Lys Thr Val Leu Gly Asn Phe Ser Ala Phe Val
 165 170 175

Ala Lys Cys Cys Gly Arg Glu Asp Lys Glu Ala Cys Phe Ala Glu Glu
 180 185 190

Gly Pro Lys Leu Val Ala
 195

<210> 15
 <211> 641
 <212> PRT
 <213> Virus 4 del herpes humano

5

<400> 15

ES 2 678 144 T3

Met Ser Asp Glu Gly Pro Gly Thr Gly Pro Gly Asn Gly Leu Gly Glu
 1 5 10 15

Lys Gly Asp Thr Ser Gly Pro Glu Gly Ser Gly Gly Ser Gly Pro Gln
 20 25 30

Arg Arg Gly Gly Asp Asn His Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly
 35 40 45

Arg Gly Gly Gly Arg Pro Gly Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro
 50 55 60

Arg His Arg Asp Gly Val Arg Arg Pro Gln Lys Arg Pro Ser Cys Ile
 65 70 75 80

Gly Cys Lys Gly Thr His Gly Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly
 85 90 95

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly
 100 105 110

ES 2 678 144 T3

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly
 115 120 125

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala
 130 135 140

Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly
 145 150 155 160

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly
 165 170 175

Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly
 180 185 190

Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly
 195 200 205

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala
 210 215 220

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala
 225 230 235 240

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala
 245 250 255

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala
 260 265 270

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly
 275 280 285

Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala
 290 295 300

Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly
 305 310 315 320

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly
 325 330 335

Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly
 340 345 350

Arg Arg Gly Arg Gly Arg Glu Arg Ala Arg Gly Gly Ser Arg Glu Arg
 355 360 365

Ala Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Glu Lys Arg Pro Arg Ser Pro

ES 2 678 144 T3

370																			
Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Arg	Pro	Pro	Pro				
385					390					395					400				
Gly	Arg	Arg	Pro	Phe	Phe	His	Pro	Val	Gly	Glu	Ala	Asp	Tyr	Phe	Glu				
				405					410					415					
Tyr	His	Gln	Glu	Gly	Gly	Pro	Asp	Gly	Glu	Pro	Asp	Val	Pro	Pro	Gly				
			420					425					430						
Ala	Ile	Glu	Gln	Gly	Pro	Ala	Asp	Asp	Pro	Gly	Glu	Gly	Pro	Ser	Thr				
		435					440					445							
Gly	Pro	Arg	Gly	Gln	Gly	Asp	Gly	Gly	Arg	Arg	Lys	Lys	Gly	Gly	Trp				
	450					455					460								
Phe	Gly	Lys	His	Arg	Gly	Gln	Gly	Gly	Ser	Asn	Pro	Lys	Phe	Glu	Asn				
465					470					475					480				
Ile	Ala	Glu	Gly	Leu	Arg	Ala	Leu	Leu	Ala	Arg	Ser	His	Val	Glu	Arg				
				485					490					495					
Thr	Thr	Asp	Glu	Gly	Thr	Trp	Val	Ala	Gly	Val	Phe	Val	Tyr	Gly	Gly				
			500					505					510						
Ser	Lys	Thr	Ser	Leu	Tyr	Asn	Leu	Arg	Arg	Gly	Thr	Ala	Leu	Ala	Ile				
		515					520					525							
Pro	Gln	Cys	Arg	Leu	Thr	Pro	Leu	Ser	Arg	Leu	Pro	Phe	Gly	Met	Ala				
	530					535					540								
Pro	Gly	Pro	Gly	Pro	Gln	Pro	Gly	Pro	Leu	Arg	Glu	Ser	Ile	Val	Cys				
545					550					555					560				
Tyr	Phe	Met	Val	Phe	Leu	Gln	Thr	His	Ile	Phe	Ala	Glu	Val	Leu	Lys				
				565					570					575					
Asp	Ala	Ile	Lys	Asp	Leu	Val	Met	Thr	Lys	Pro	Ala	Pro	Thr	Cys	Asn				
			580					585					590						
Ile	Arg	Val	Thr	Val	Cys	Ser	Phe	Asp	Asp	Gly	Val	Asp	Leu	Pro	Pro				
		595					600					605							
Trp	Phe	Pro	Pro	Met	Val	Glu	Gly	Ala	Ala	Ala	Glu	Gly	Asp	Asp	Gly				
	610					615					620								
Asp	Asp	Gly	Asp	Glu	Gly	Gly	Asp	Gly	Asp	Glu	Gly	Glu	Glu	Gly	Gln				
625					630					635					640				

Glu

- 5
- <210> 16
 - <211> 1926
 - <212> ADN
 - <213> Virus 4 del herpes humano

 - <400> 16

ES 2 678 144 T3

atgtctgacg agggggccagg tacaggacct ggaaatggcc taggagagaa gggagacaca 60
 tctggaccag aaggctccgg cggcagtgga cctcaaagaa gagggggtga taaccatgga 120
 cgaggacggg gaagaggacg aggacgagga ggcggaagac caggagcccc gggcggtca 180
 ggatcagggc caagacatag agatggtgtc cggagacccc aaaaacgtcc aagttgcatt 240
 ggctgcaaag ggaccacagg tggaacagga gcaggagcag gagcgggagg ggcaggagca 300
 ggaggggagc gagcaggagg aggggcagga gcaggaggag gggcaggagg ggcaggaggg 360
 gcaggagggg caggagcagg aggaggggca ggagcaggag gaggggcagg aggggcagga 420
 ggggcaggag caggaggagg ggcaggagca ggaggagggg caggaggggc aggagcagga 480
 ggaggggagc gaggggcagg aggggcagga gcaggaggag gggcaggagc aggaggaggg 540
 gcaggagggg caggagcagg aggaggggca ggaggggagc gaggggcagg agcaggagga 600
 ggggcaggag caggaggggc aggaggggca ggaggggagc gagcaggagg ggcaggagca 660
 ggaggagggg caggaggggc aggaggggca ggagcaggag gggcaggagc aggaggggca 720
 ggagcaggag gggcaggagc aggaggggca ggaggggagc gagcaggagg ggcaggaggg 780
 gcaggagcag gaggggcagg aggggcagga gcaggaggag gggcaggagg ggcaggagca 840
 ggaggagggg caggaggggc aggagcagga ggggcaggag gggcaggagc aggaggggca 900
 ggaggggagc gagcaggagg ggcaggaggg gcaggagcag gaggaggggc aggagcagga 960
 ggggcaggag caggaggtgg aggccggggt cgaggaggca gtggaggccg gggtcgagga 1020
 ggtagtggag gccggggtcg aggaggtagt ggaggccgcc ggggtagagg acgtgaaaga 1080
 gccagggggg gaagtctga aagagccagg gggagaggtc gtggacgtgg agaaaagagg 1140
 cccaggagtc ccagtagtca gtcatcatca tccgggtctc caccgcgag gccccctcca 1200
 ggtagaaggc ctttttcca ccctgtaggg gaagccgatt attttgaata ccaccaagaa 1260
 ggtggcccag atggtgagcc tgacgtgcc cgggagcga tagagcaggg ccccgcat 1320
 gaccaggag aaggcccaag cactggacc cggggtcagg gtgatggagg caggcgaaa 1380
 aaaggagggt ggtttgaaa gcatcgtggt caaggaggtt ccaacccgaa atttgagaac 1440
 attgcagaag gtttaagagc tctcctggct aggagtcacg tagaaaggac taccgacgaa 1500
 ggaacttggg tcgccggtgt gttcgtatat ggaggtagta agacctccct ttacaaccta 1560
 aggcgaggaa ctgcccttgc tattccacaa tgctgtctta caccattgag tcgtctcccc 1620

ES 2 678 144 T3

tttggaatgg cccctggacc cggcccacaa cctggcccgc taagggagtc cattgtctgt	1680
tatttcatgg tctttttaca aactcatata tttgctgagg ttttgaagga tgcgattaag	1740
gaccttgтта tgacaaagcc cgctcctacc tgcaatatca gggtgactgt gtgcagcttt	1800
gacgatggag tagatttgcc tccctggttt ccacctatgg tggaaggggc tgccgcggag	1860
ggtgatgacg gagatgacgg agatgaagga ggtgatggag atgaggggtga ggaagggcag	1920
gagtga	1926

5 <210> 17
<211> 1976
<212> ADN
<213> Virus 4 del herpes humano

<400> 17

ES 2 678 144 T3

cctttatgtg taactcttgg ctgaagctct tacaccaatg ctgggggaca tgtacctccc	60
aggggcccag gaagactacg ggaggctaca ccaacgtcaa tcagaggggc ctgtgtagct	120
accgataagc ggaccctcaa gagggcatta gcaatagtgt ttataaggcc cccttgtaa	180
ccctaaacgg gtagcatatg cttcccgggt agtagtatat actatccaga ctaaccctaa	240
ttcaatagca tatgttacct aacgggaagc atatgctatc gaattagggt tagtaaaagg	300
gtcctaagga acagcgatat ctcccacccc atgagctgtc acggttttat ttacatgggg	360
tcaggattcc acgagggtag tgaaccattt tagtcacaag ggcagtggtc gaagatcaag	420
gagcgggcag tgaactctcc tgaatcttcg cctgcttctt cattctcctt cgtttagcta	480
atagaataac tgctgagttg tgaacagtaa ggtgtatgtg aggtgctcga aaacaaggtt	540
tcaggtgacg cccccagaat aaaatttggg cgggggggtc agtggtggca ttgtgctatg	600
acaccaatat aaccctcaca aacccttgg gcaataaata ctagttagg aatgaaacat	660
tctgaatatc tttacaata gaaatccatg ggggggggac aagccgtaa gactggatgt	720
ccatctcaca cgaatttatg gctatgggca acacataatc ctagtgcaat atgatactgg	780
ggttattaag atgtgtccca ggcagggacc aagacaggtg aaccatgttg ttacactcta	840
tttgtaacaa ggggaaagag agtggacgcc gacagcagcg gactccactg gttgtctcta	900
acacccccga aaattaaacg gggctccacg ccaatggggc ccataaacia agacaagtgg	960
ccactctttt ttttgaaatt gtggagtggg ggcacgcgtc agccccaca cgccgccctg	1020
cggttttgga ctgtaaaata aggggtgtaat aacttggtc attgtaacc cgttaaccac	1080
tgcggtcaaa ccacttgccc acaaaaccac taatggcacc ccggggaata cctgcataag	1140
taggtgggcg ggccaagata ggggcgcgat tgctgcgatc tggaggacaa attacacaca	1200
cttgcgcctg agcgccaagc acagggttgt tggctcctcat attcacgagg tcgctgagag	1260
cacgggtggc taatgttgcc atgggtagca tatactacct aaatatctgg atagcatatg	1320
ctatccta atctatatctgg gtagcatagg ctatccta atctatatctgg gtagcatatg	1380

ES 2 678 144 T3

ctatccta	ctatatctgg	gtagtatatg	ctatccta	ttatatctgg	gtagcatagg	1440
ctatccta	ctatatctgg	gtagcatatg	ctatccta	ctatatctgg	gtagtatatg	1500
ctatccta	ctgtatccgg	gtagcatatg	ctatccta	agagattagg	gtagtatatg	1560
ctatccta	ttatatctgg	gtagcatata	ctacccaa	atctggatag	catatgctat	1620
cctaactat	atctgggtag	catatgctat	cctaactat	atctgggtag	cataggctat	1680
cctaactat	atctgggtag	catatgctat	cctaactat	atctgggtag	tatatgctat	1740
cctaattat	atctgggtag	cataggctat	cctaactat	atctgggtag	catatgctat	1800
cctaactat	atctgggtag	tatatgctat	cctaactgt	atccgggtag	catatgctat	1860
cctcatgcat	atacagtcag	catatgatac	ccagtagtag	agtgggagtg	ctatcctttg	1920
catatgccgc	cacctccaa	gggggcgtga	atcttgcgtg	cttgccttt	tcctgc	1976

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende una parte de seroalbúmina humana (SAH), cuya parte de SAH comprende el dominio III de SAH o un fragmento de unión al receptor Fc neonatal (FcRn) del mismo, en el que:
- 5 el dominio III de SAH comprende una o más sustituciones de aminoácido en cualquiera de las siguientes posiciones, numeradas respecto a la posición en la SAH madura de longitud completa (SEQ ID NO: 2): resto 407, resto 415, resto 424, resto 426, resto 463, resto 506, resto 508, resto 509, resto 511, resto 512, resto 515, resto 521, resto 523, resto 524, resto 526, resto 535 y resto 557;
- 10 la una o más sustituciones de aminoácido aumentan una o ambas de la afinidad por FcRn y semivida en suero del polipéptido respecto a un polipéptido de control en que la parte de SAH no incluye dichas sustituciones de aminoácido; y en el que,
- 15 las sustituciones de aminoácido en la posición 506 se seleccionan de T506F, T506W, T506Y; las sustituciones de aminoácido en la posición 508 se seleccionan de T508K, T508R, T508S; y las sustituciones de aminoácido en la posición 535 se seleccionan de H535D, H535E, H535P.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido se une a FcRn con una mayor afinidad que dicho polipéptido de control, y en el que dicha afinidad se mide a pH ácido.
- 20 3. El polipéptido de la reivindicación 1 o 2, en el que el dominio III de SAH comprende una o más sustituciones de aminoácido en las posiciones seleccionadas de las posiciones 463, 508, 523 y 524.
4. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que al menos una de dichas sustituciones de aminoácido en el dominio III de SAH se selecciona del grupo que consiste en: L407F, L407N, L407Q, L407W, L407Y, V415C, V415S, V415T, V424A, V424G, V424I, V424L, V424N, V424Q, V426D, V426E, V426H, V426P, L463N, L463Q, F509C, F509I, F509L, F509M, F509V, F509W, F509Y, A511F, A511W, A511Y, D512F, D512W, D512Y, T515C, T515H, T515N, T515P, T515Q, T515S, R521F, R521W, R521Y, I523A, I523D, I523E, I523F, I523G, I523K, I523L, I523N, I523Q, I523R, I523V, I523W, I523Y, K524A, K524G, K524I, K524L, K524V, Q526C, Q526M, Q526S, Q526T, Q526Y, K557A, K557G, K557I, K557L y K557V.
- 25 5. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las sustituciones de aminoácido están en las posiciones 407 y 509, o 426 y 526, o 463 y 508, o 526 y 557.
6. El polipéptido de la reivindicación 5, en el que las sustituciones de aminoácido son L407N y F509M, o V426H y Q526Y, o L463N y T508R, o Q526M y K557G.
- 35 7. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las sustituciones de aminoácido están en las posiciones 463, 508 y 523, o 463, 523 y 524.
8. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la parte de SAH comprende además al menos una parte del dominio I de SAH; o al menos una parte del dominio II de SAH; o al menos una parte del dominio I de SAH y al menos una parte del dominio II de SAH.
- 40 9. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende una proteína heteróloga o un agente no proteínico heterólogo, en el que el polipéptido retiene una actividad funcional de la proteína heteróloga o agente no proteínico heterólogo, y puede unirse a un FcRn.
- 45 10. El polipéptido de la reivindicación 9, en el que la proteína heteróloga comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 50 11. El polipéptido de la reivindicación 9 o 10, en el que la proteína heteróloga se conjuga de forma química o recombinante a la parte de SAH, o en el que el agente no proteínico heterólogo se conjuga químicamente a la parte de SAH.
- 55 12. Una composición que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o una composición de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso como un medicamento.
- 60 14. Una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

15. Un método de aumento de una o ambas de la afinidad por FcRn y la semivida en suero de una proteína, que comprende conjugar o fusionar de forma recombinante la proteína al polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 5 16. Un método de aumento de una o ambas de la afinidad por FcRn y la semivida en suero de un agente no proteínico, que comprende conjugar el agente no proteínico al polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

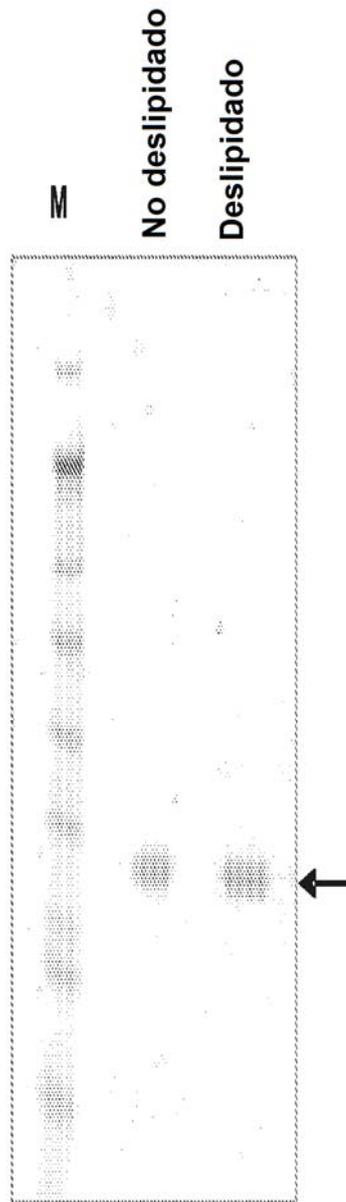


Figura 1A

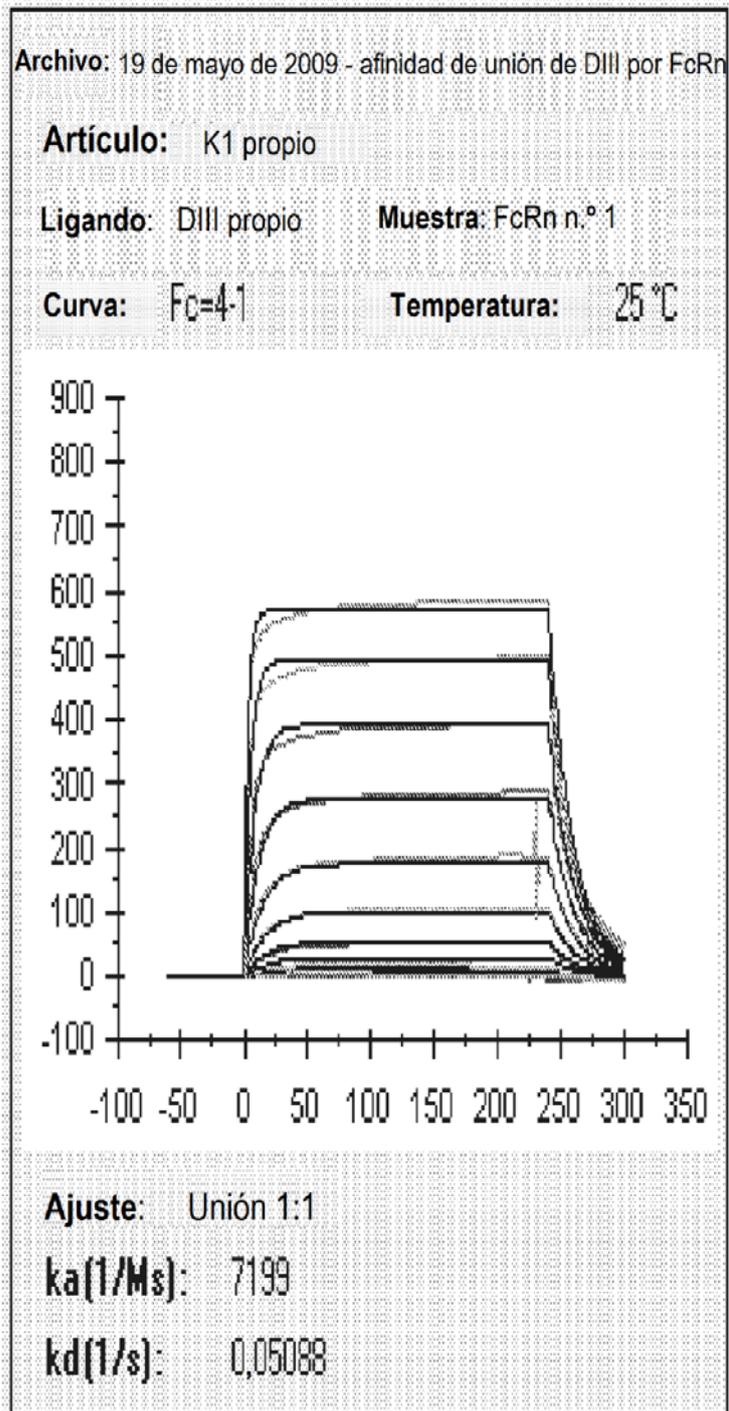


Figura 1B

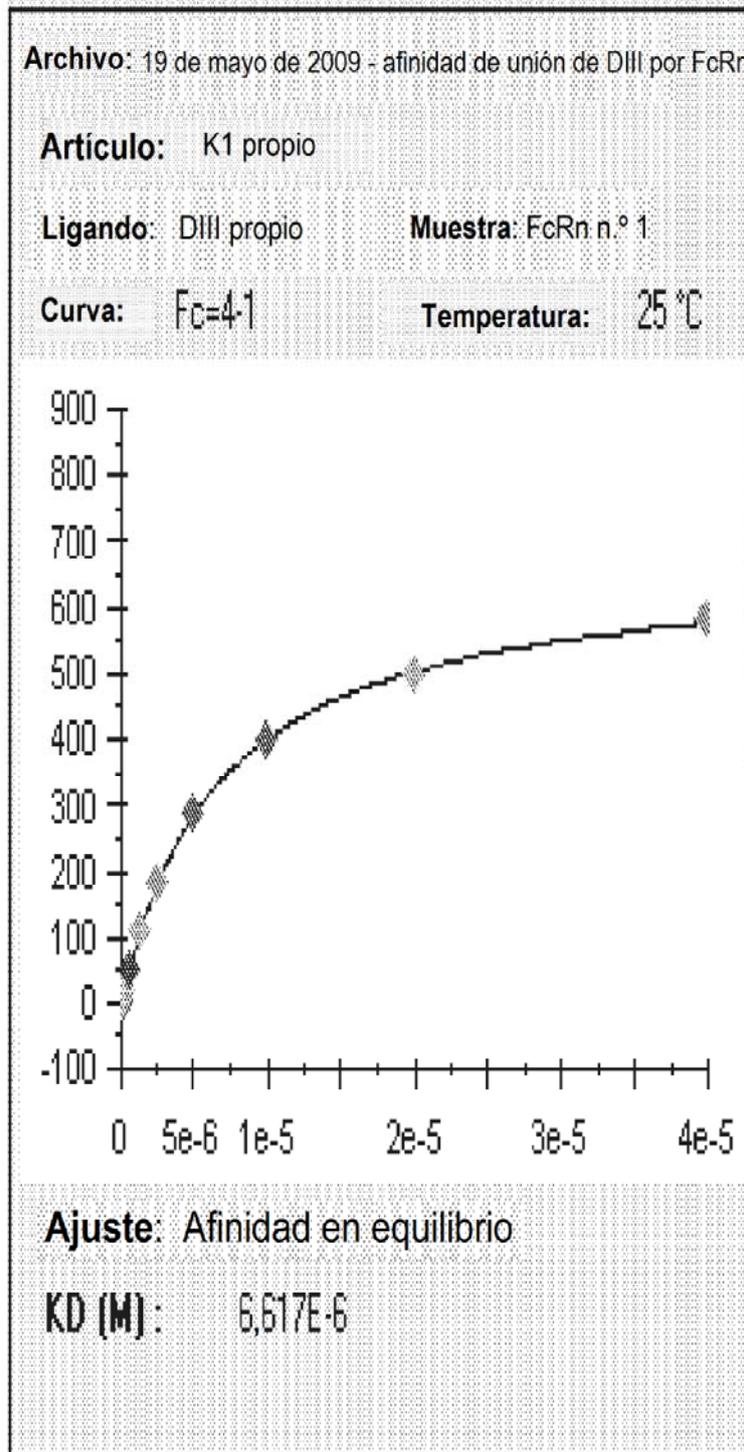


Figura 1C

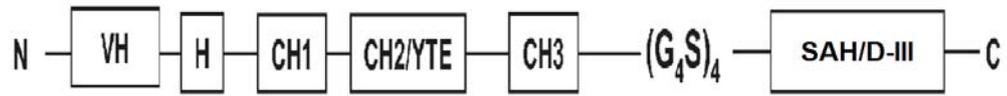


Figura 2A

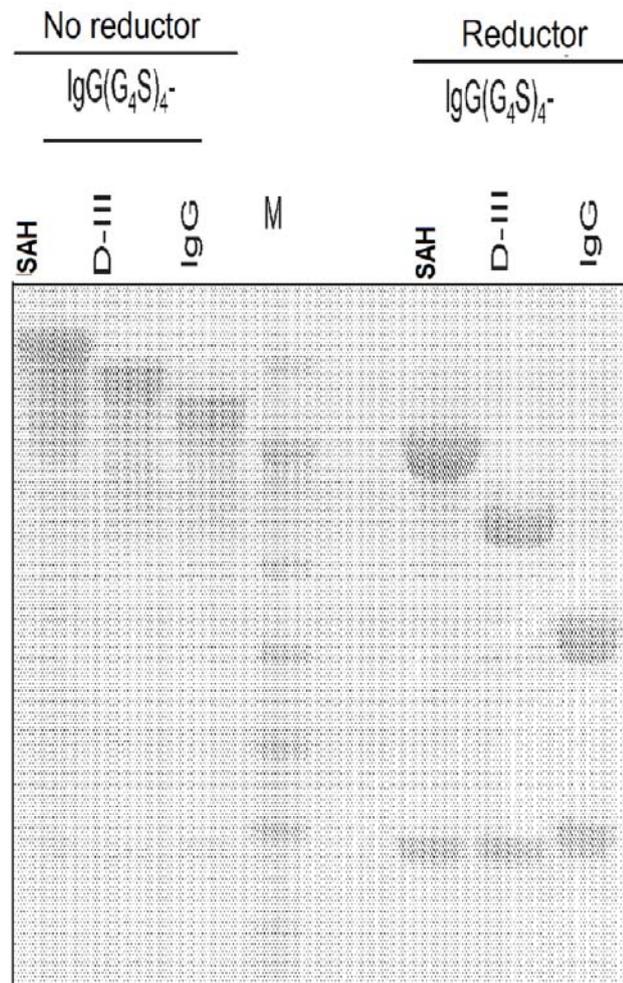


Figura 2B

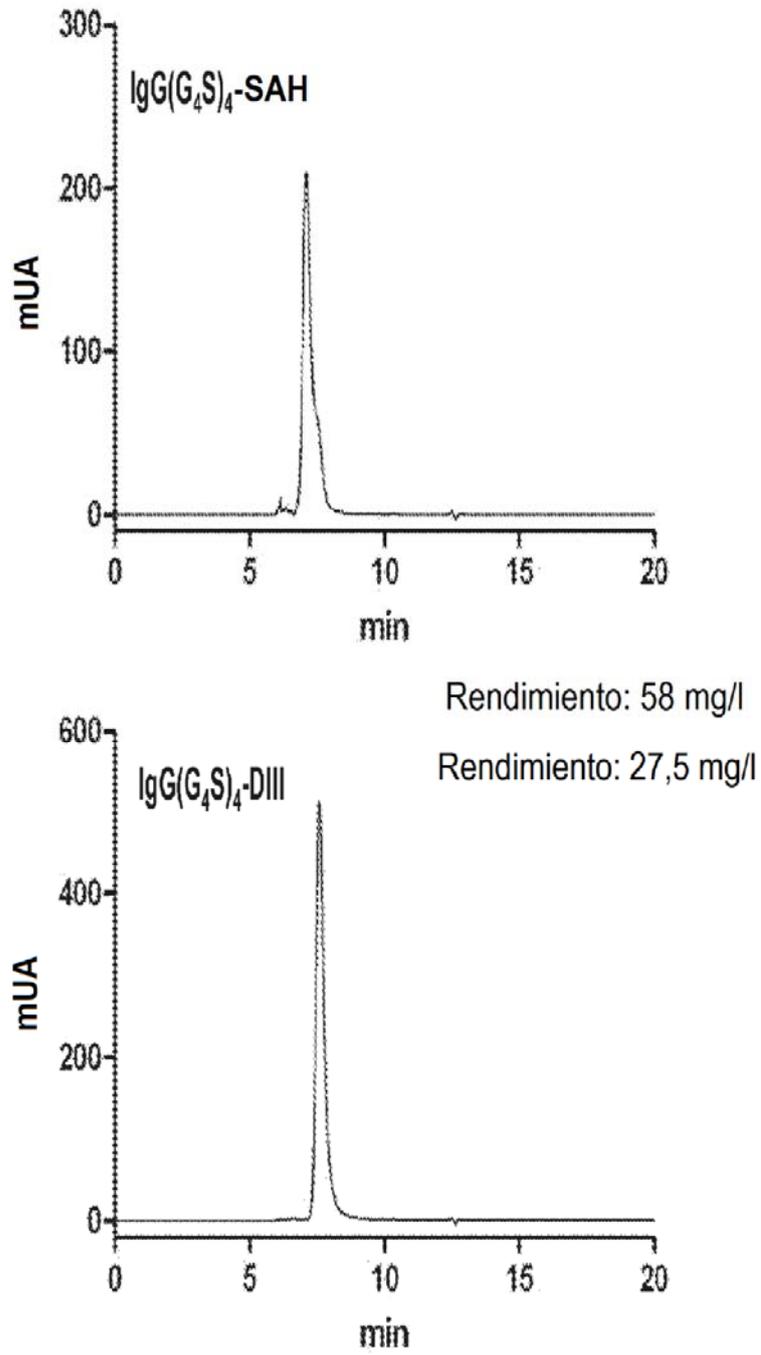


Figura 2C

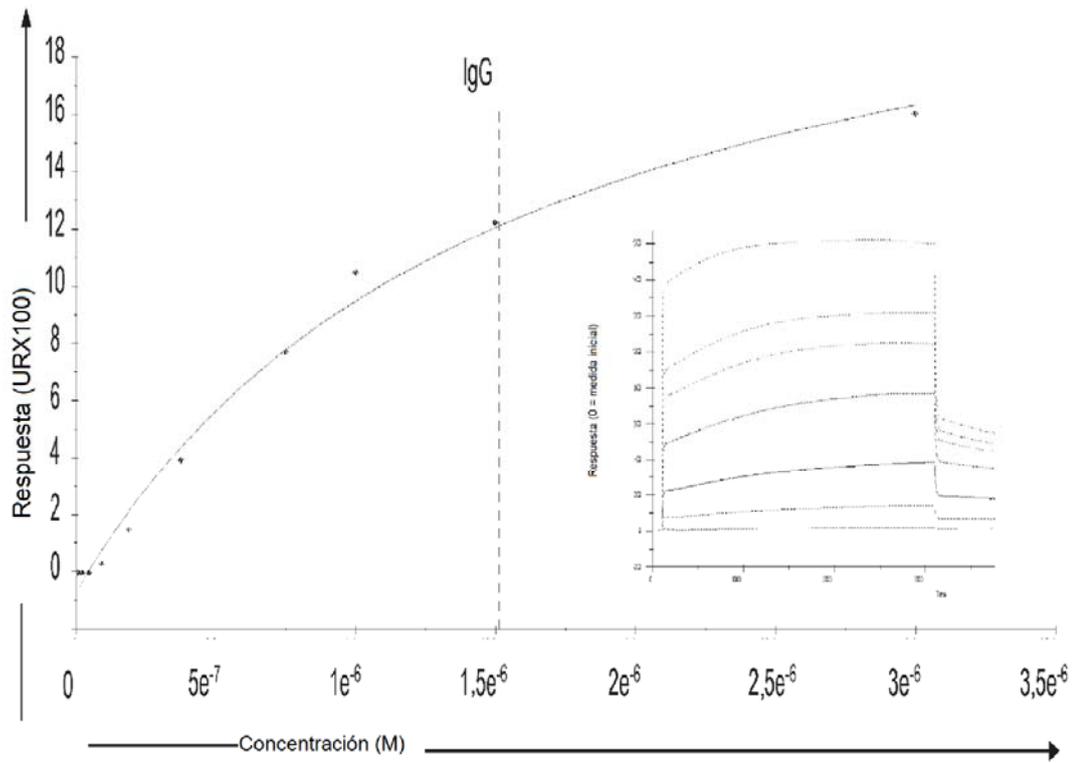


Figura 3A

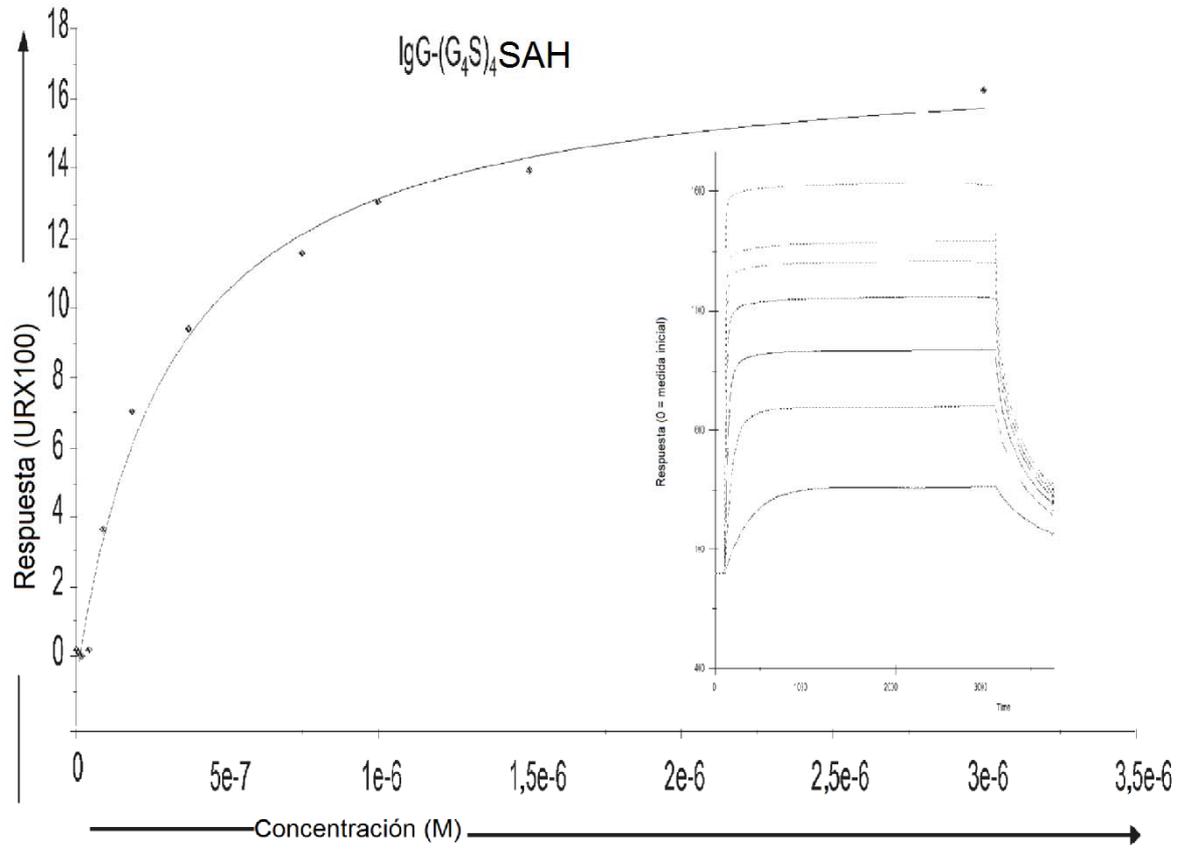


Figura 3B

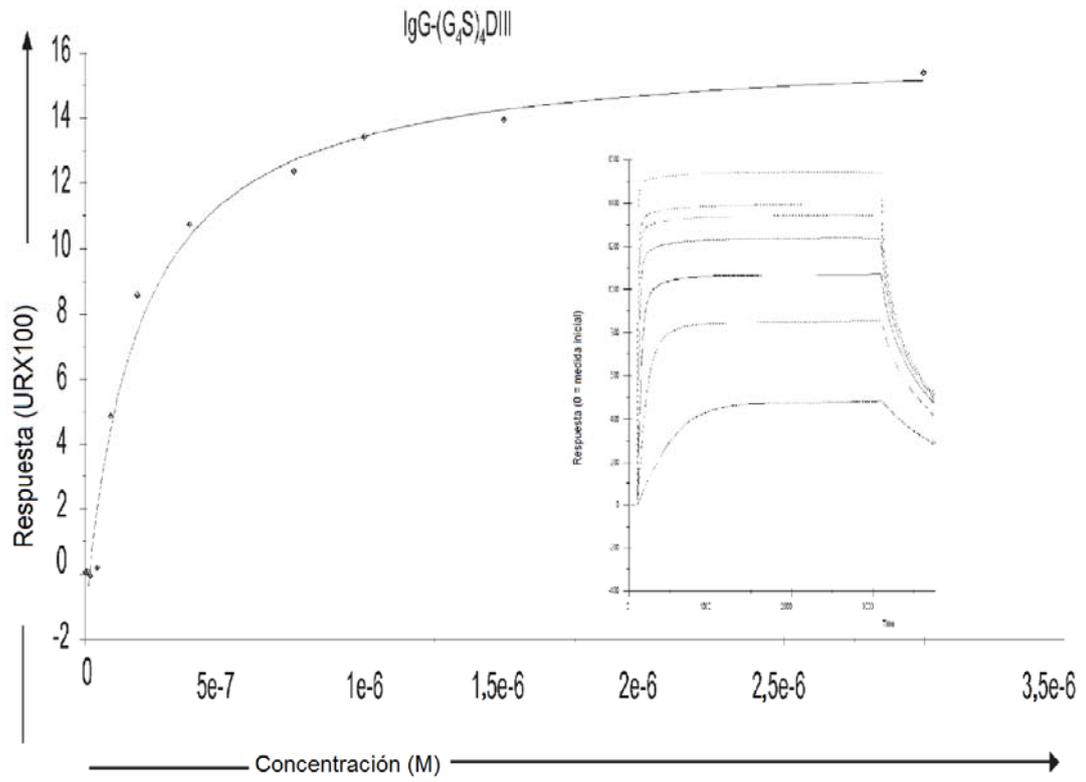


Figura 3C

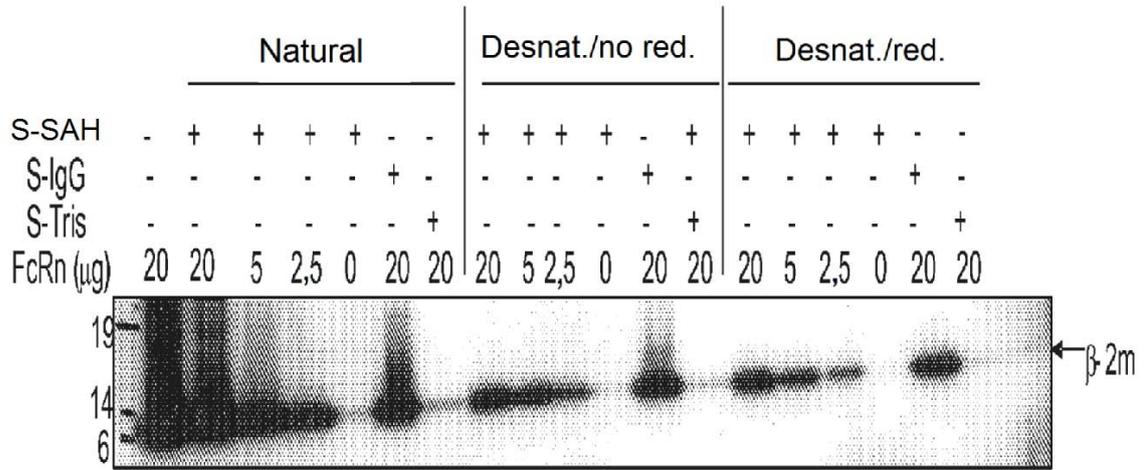


Figura 4

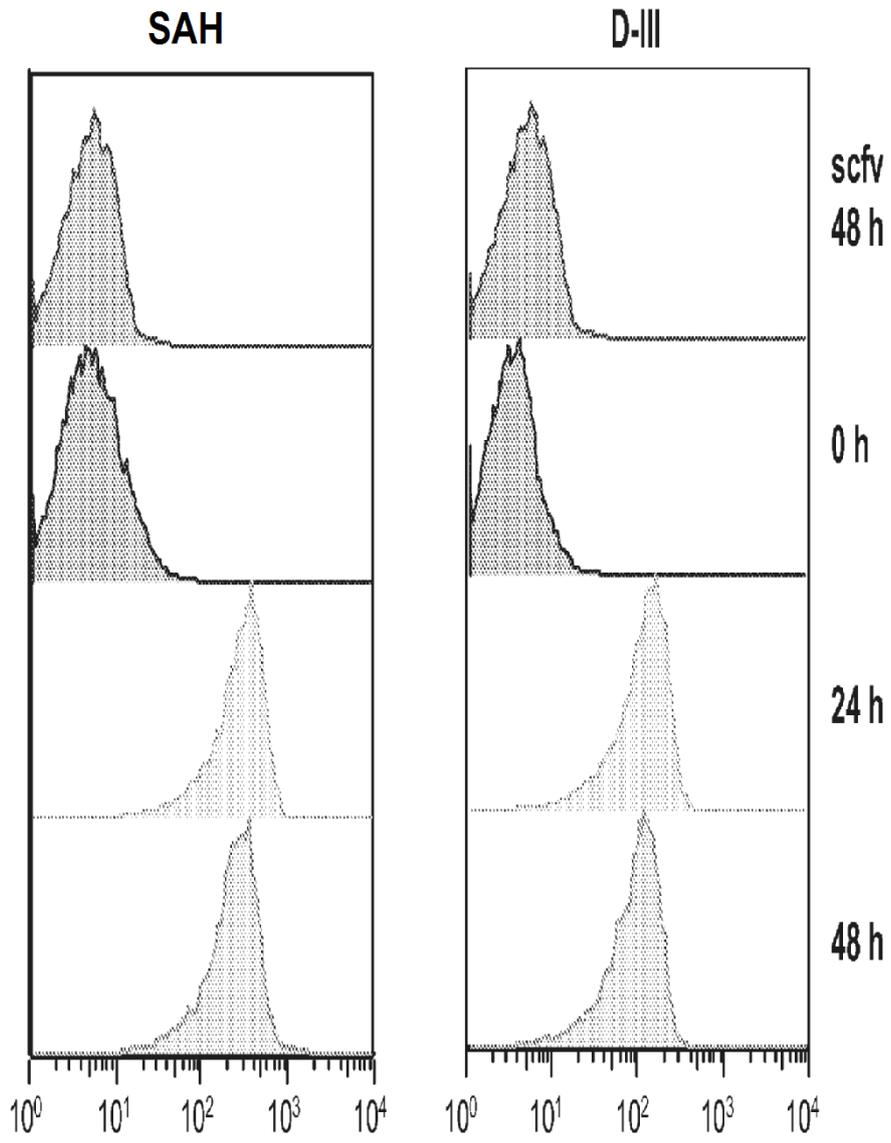


Figura 5A

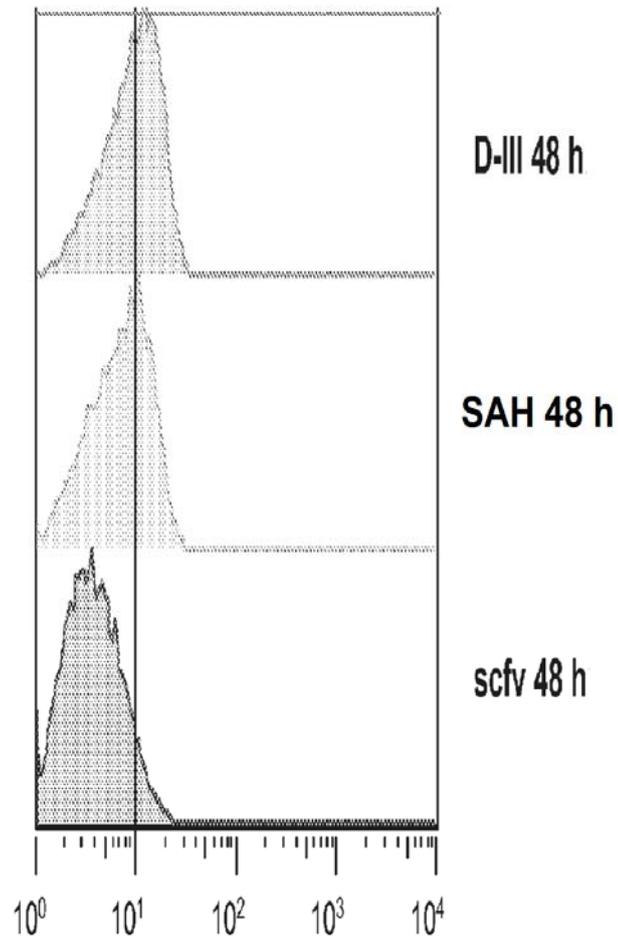


Figura 5B

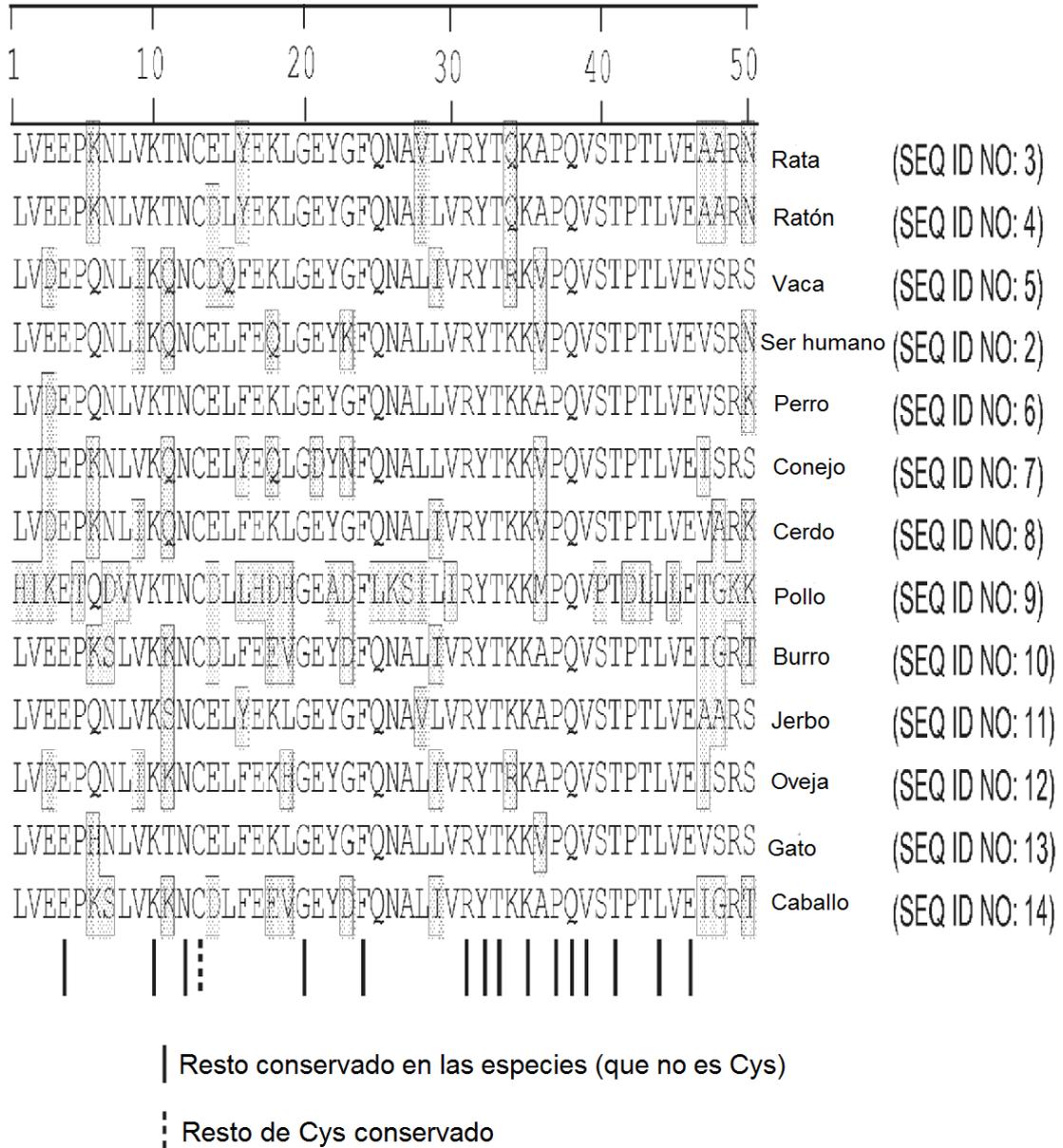


Figura 6A

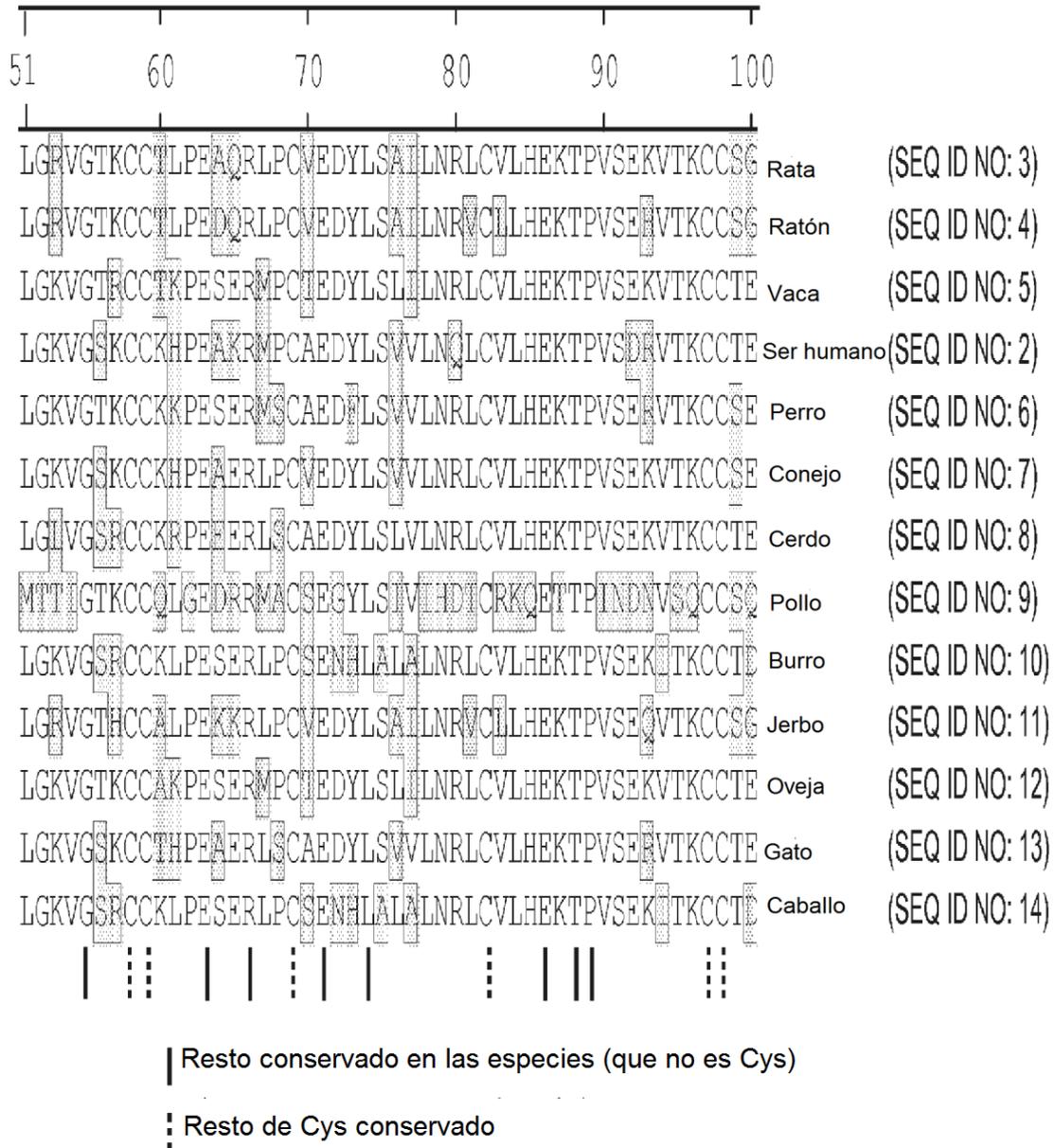


Figura 6B

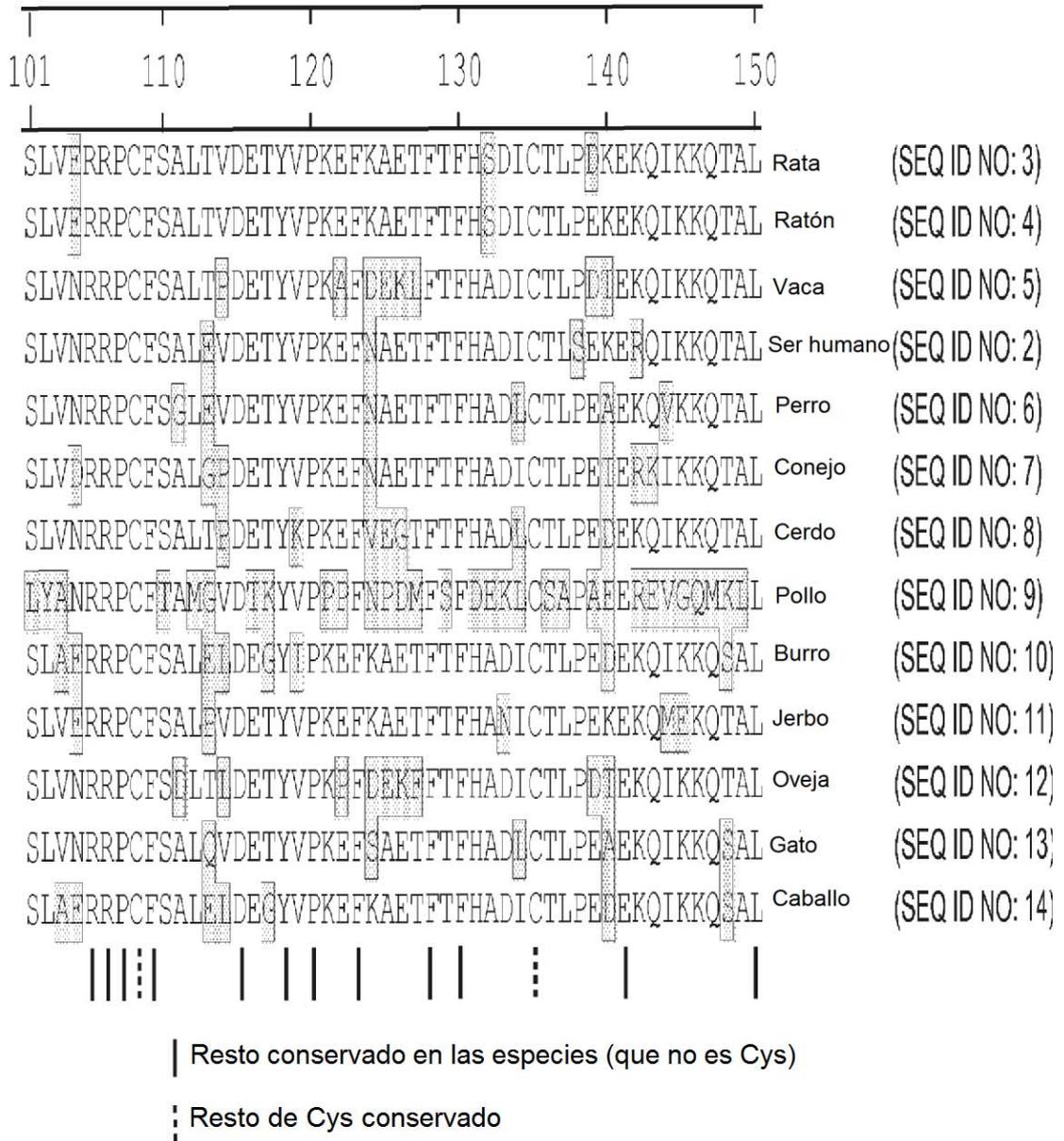


Figura 6C

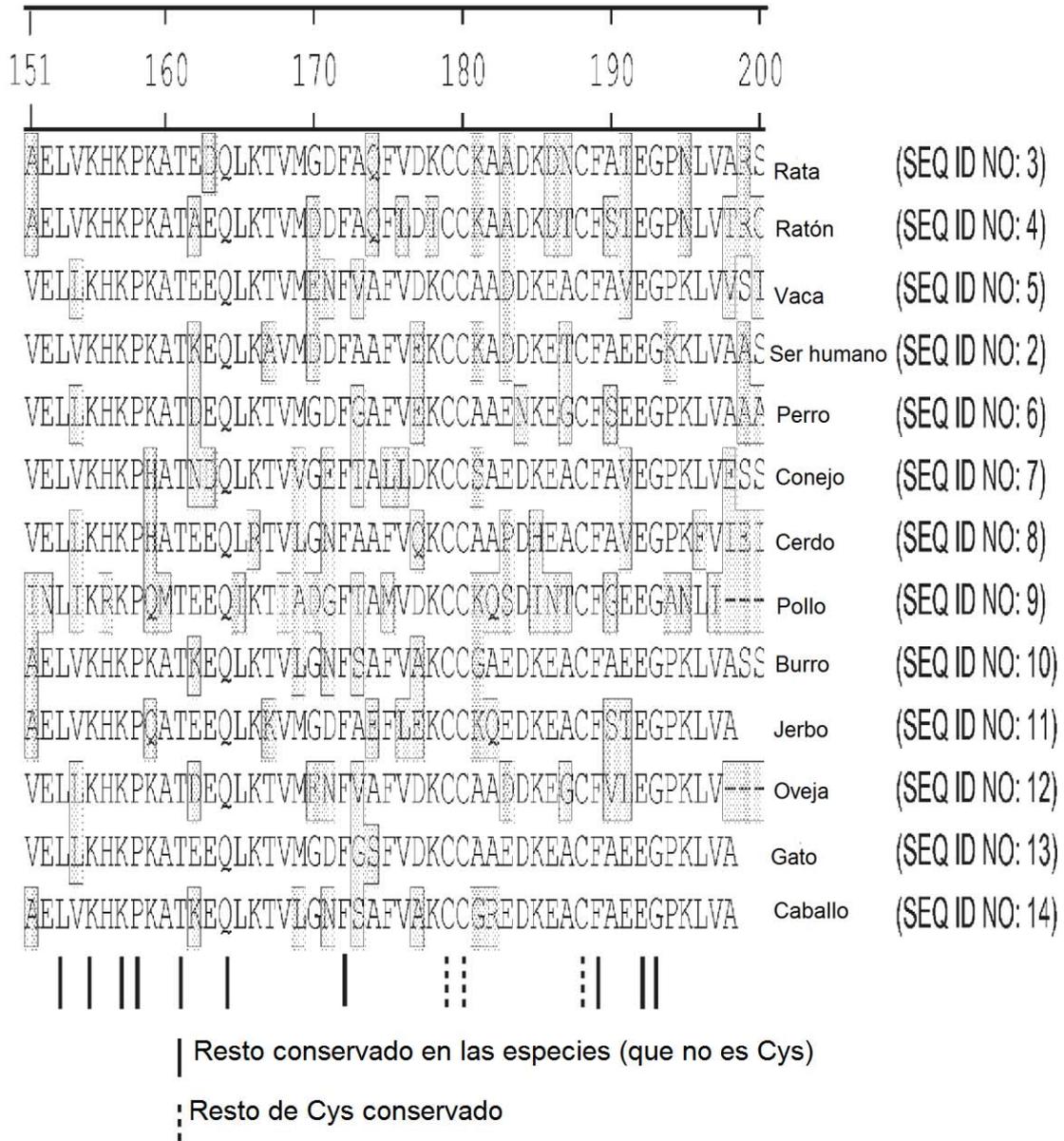


Figura 6D

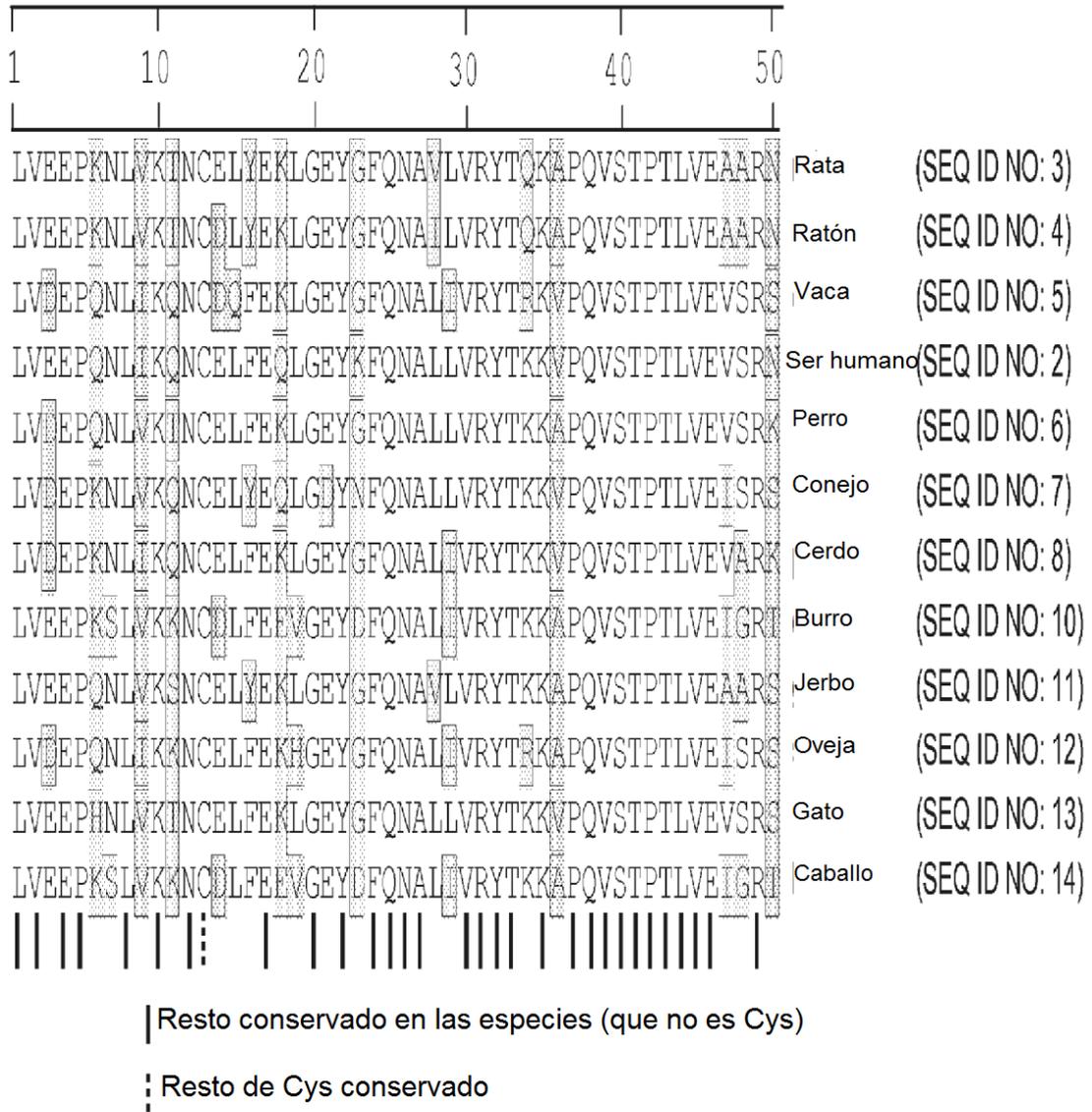


Figura 6E

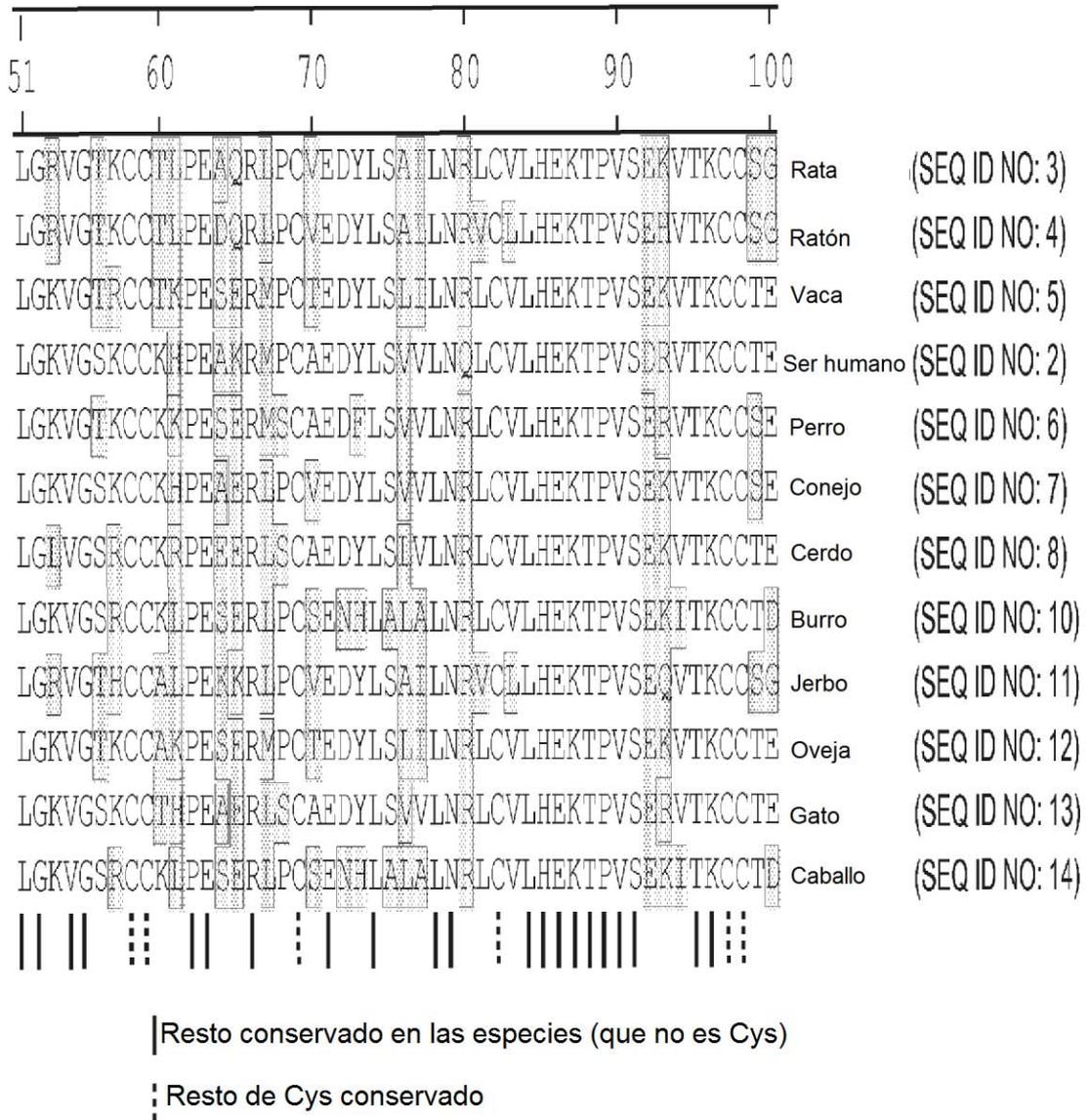


Figura 6F

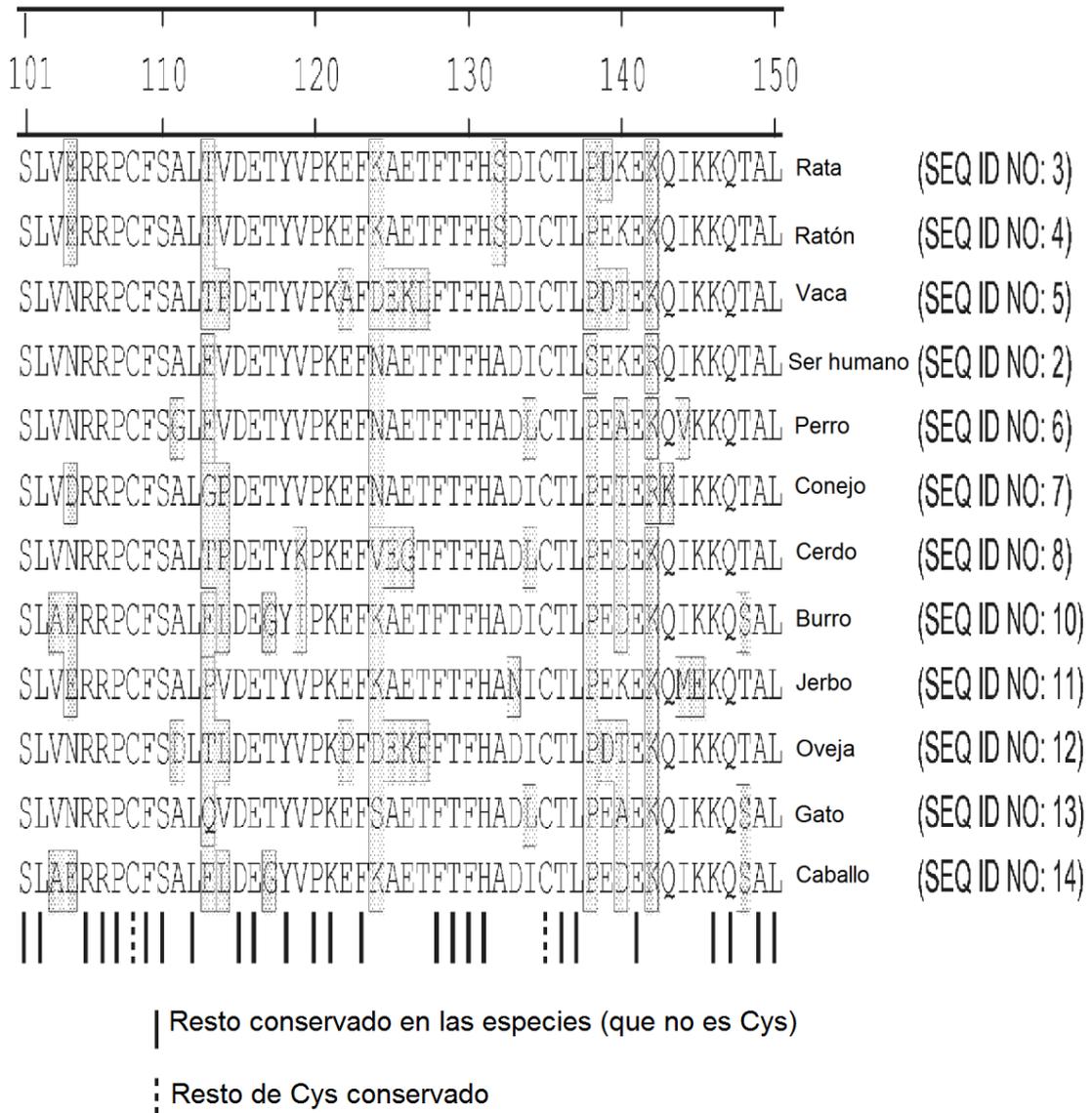


Figura 6G

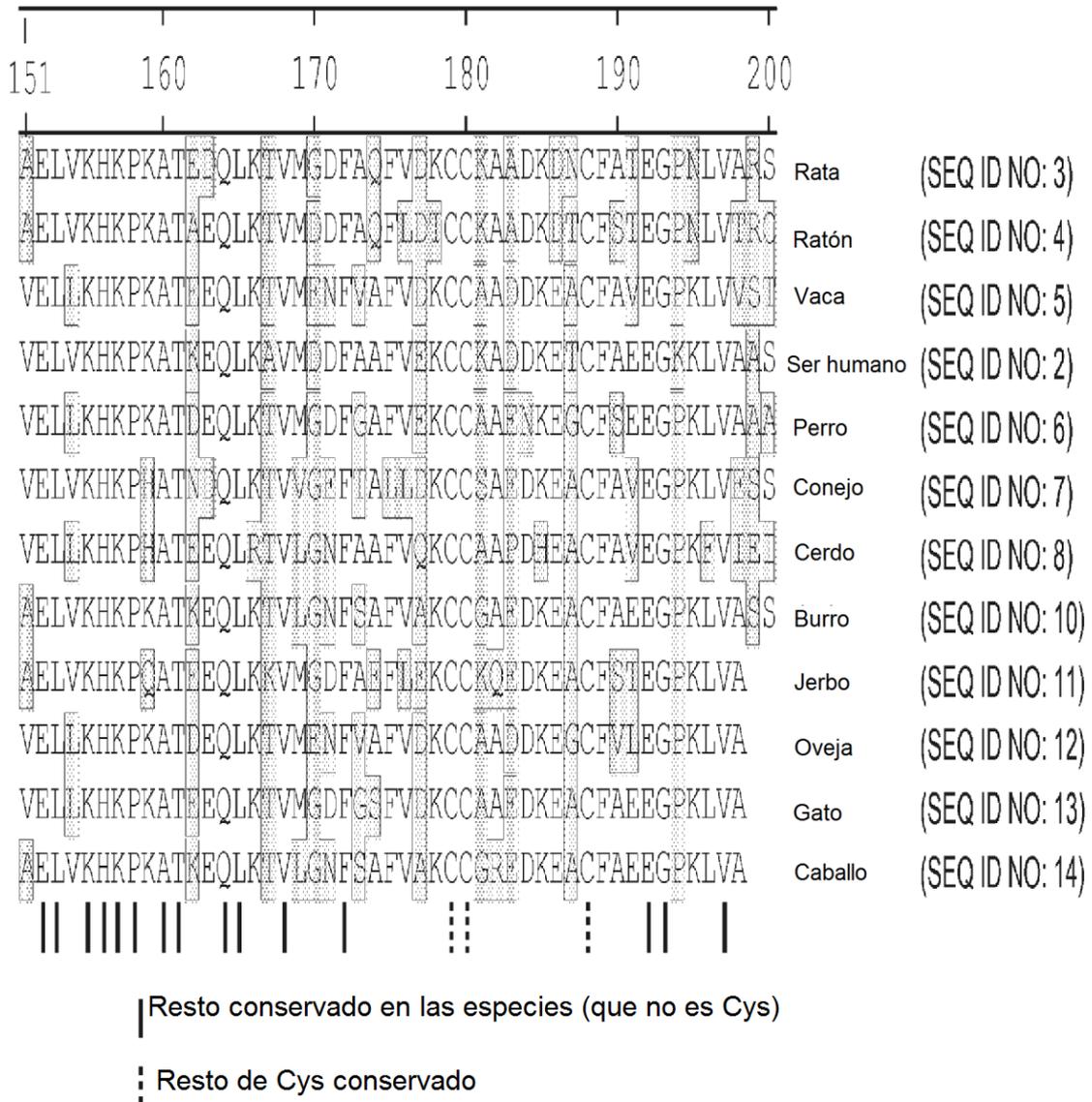


Figura 6H

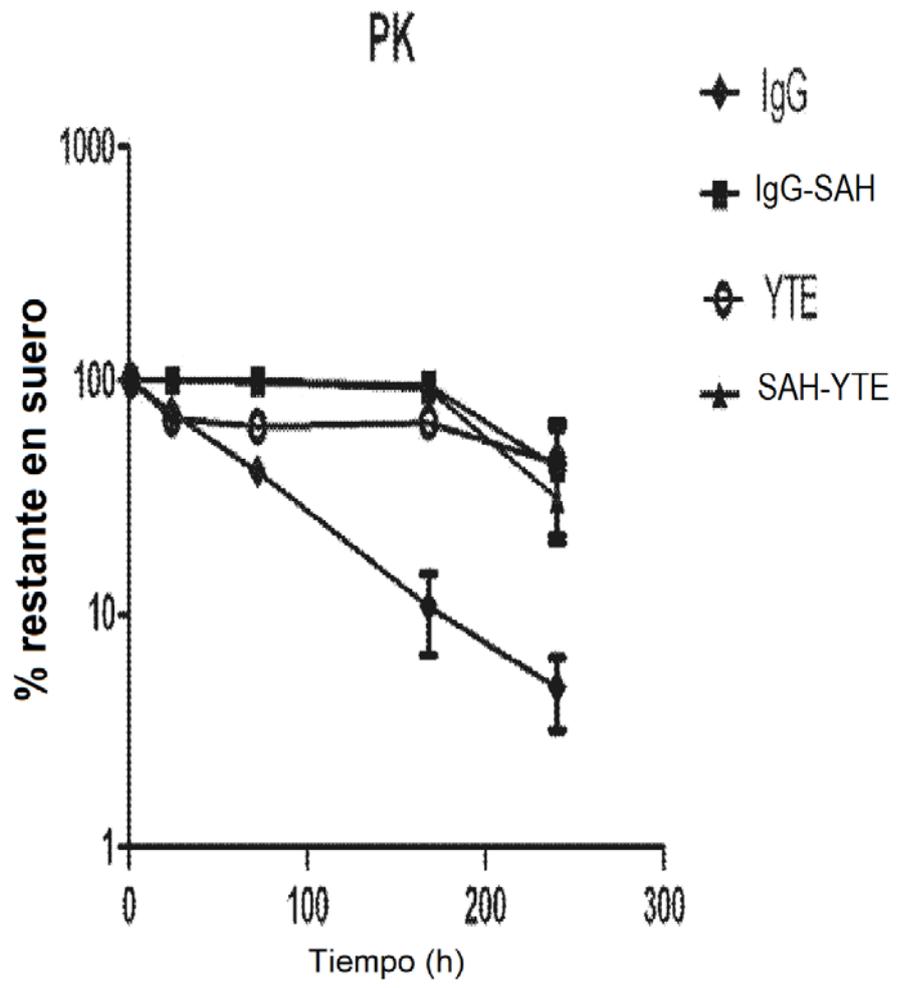


Figura 7

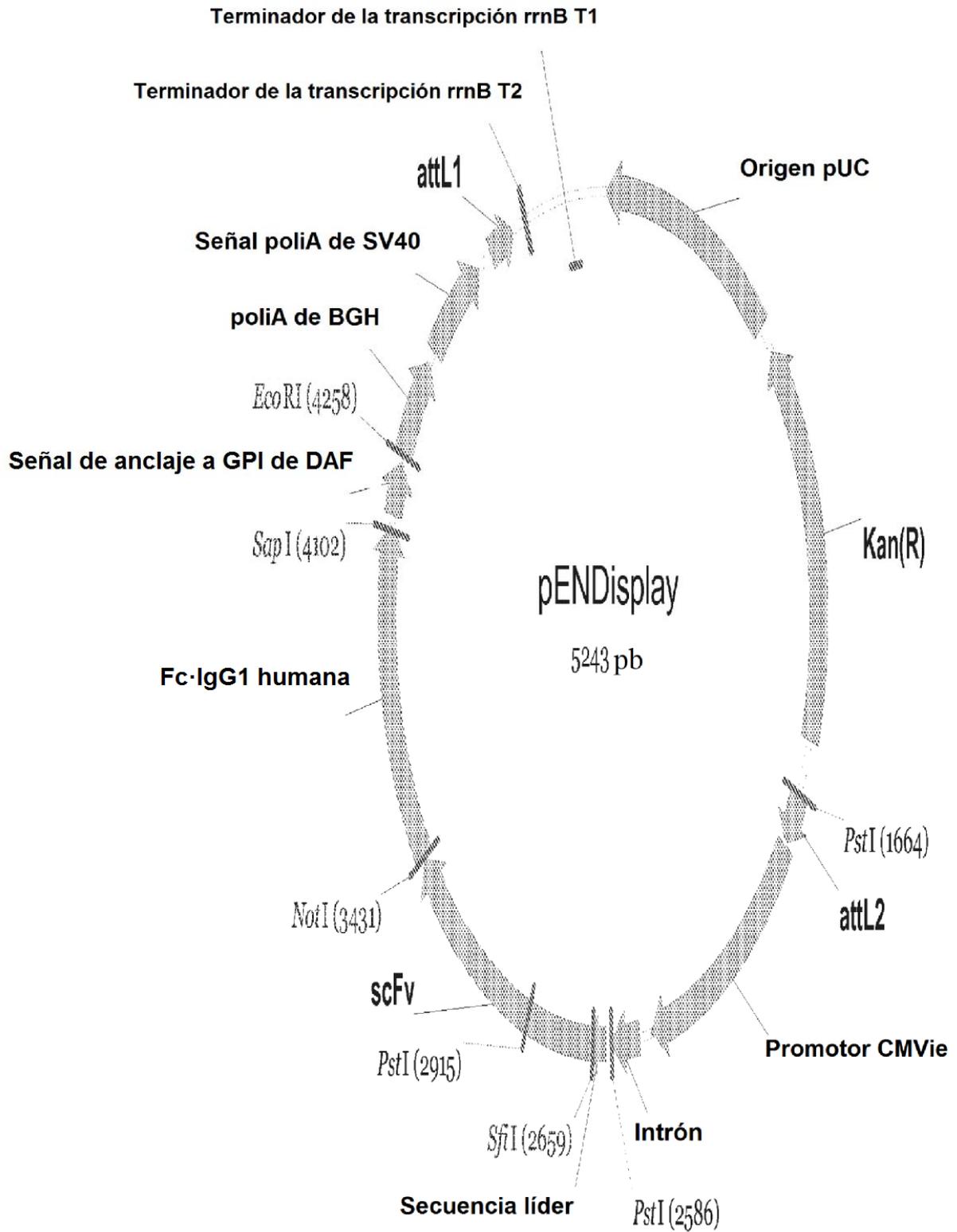


Figura 8A

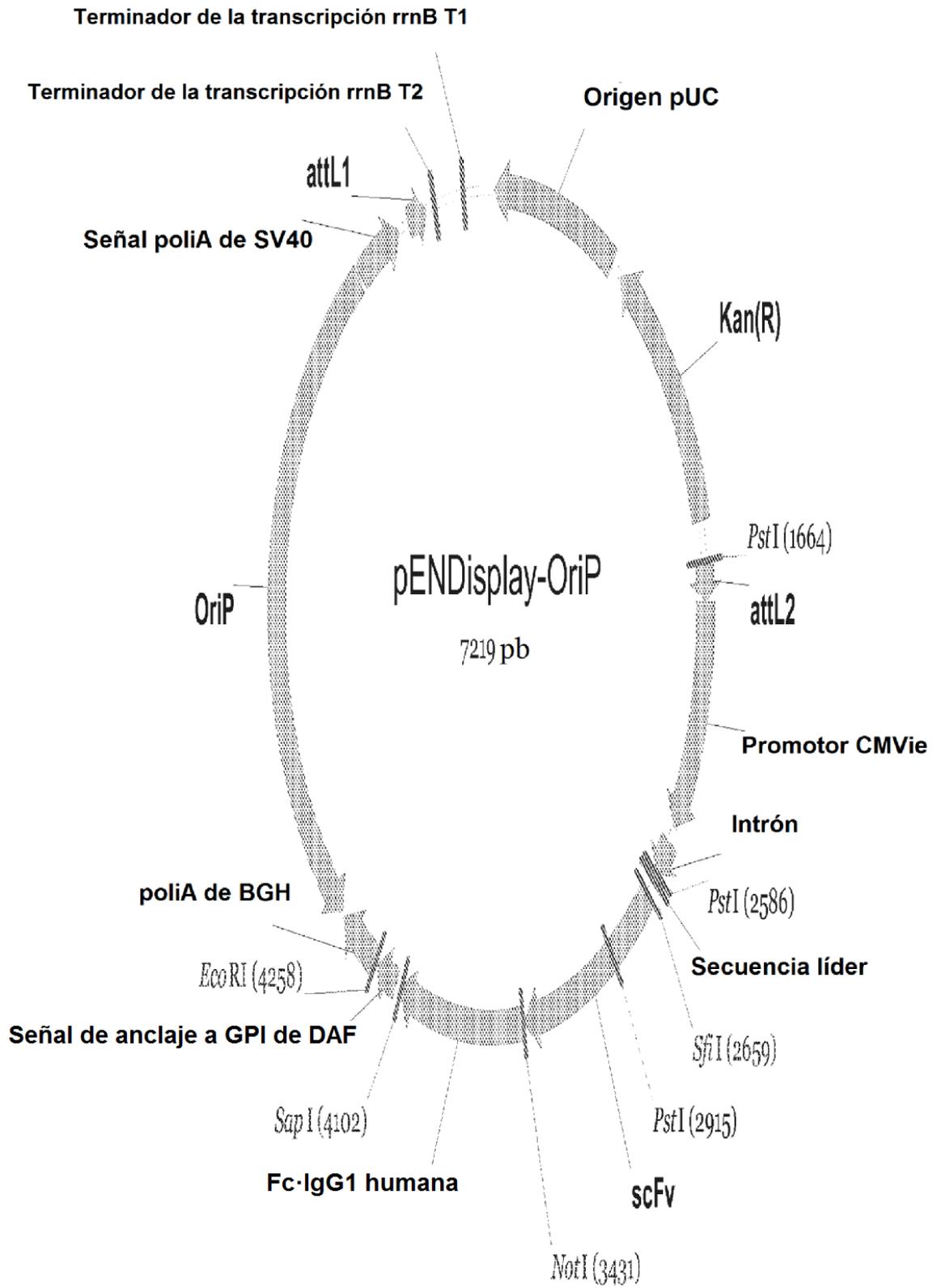


Figura 8B

Secuencia génica de EBNA-1

ATGTCCTGACGAGGGGCCAGGTACAGGACCTGGAAATGGCCTAGGAGACAAGGGAGACACATCTGGACCAGAAGGCTCCGGCGGCAGTG
 GACCTCAAAGAAGAGGGGGTGATAACCATGGACCAGGACGGGGAAGAGGACCAGGACGAGGAGGCCGAAGACCAGGAGCCCCGGGGCG
 CTCAGGATCAGGGCCAAGACATAGAGATGGTGTCCGGAGACCCAAAAACGTCCAAGTTGCATTGGCTGCAAAGGGACCCACGGTGG
 ACAGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGGGG
 CAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGG
 GGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAG
 GCAGGAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAG
 GGGCAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGC
 AGGAGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAG
 GGGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAG
 GGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAGGGGCAGGAGCAGGAGGGGCAGGAG
 AGCAGGAGGTGGAGGCCGGGTGAGGAGGCAGTGGAGGCCGGGTGAGGAGGTAGTGGAGGCCGGGTGAGGAGGTAGTGGAGGCCGGGTGAGGAGGTAGTGGAGGC
 CGCCGGGTAGAGGACGTGAAAGAGCCAGGGGGGAAGTCGTGAAAGAGCCAGGGGGAGAGGTGCTGGACGTGGAGAAAAGAGCCCA
 GGAGTCCAGTAGTCAGTCATCATCCGGTCTCCACCGCAGGCCCCCTCCAGGTAGAAGGCCATTTTTCCACCCTGTAGGGGA
 AGCCGATTATTTGAATACCACCAAGAAGGTGGCCAGATGGTGAGCCTGACGTGCCCCGGGAGCGATAGAGCAGGGCCCCGAGAT
 GACCCAGGAGAAGGCCAAGCACTGGACCCGGGTGAGGGTATGGAGGCAGGCGCAAAAAGGAGGGTGGTTTGGAAAGCATCGTG
 GTC AAGGAGGTTCCAACCCGAAATTTGAGAACATTGCAGAAGGTTAAGAGCTCTCCTGGCTAGGAGTCACGTAGAAAGGACTACCGA
 CGAAGGAACTTGGGTGCGCGGTGTGTTGATATGAGGAGTAGTAAGACCTCCCTTTACAACCTAAGGCGAGGAACTGCCCTTGCTATT
 CCACAATGTCGTCCTACACCATTGAGTCGTCCTCCCTTTGGAATGGCCCTGGACCCGGCCACAACCTGGCCCGCTAAGGGAGTCCA
 TTGTCGTGTTATTTCAATGGTCTTTTACAACTCATATATTTGCTGAGGTTTTGAAGGATGCGATTAAGGACCTTGTTATGACAAAGCC
 CGCTCCTACCTGCAATATCAGGGTACTGTGTGCAGCTTTGACGATGGAGTAGATTTGCCTCCCTGGTTTCCACCTATGGTGGAAAGGG
 GCTGCCCGGAGGGTATGACGGAGATGACGGAGATGAAGGAGGTGATGGAGATGAGGGTGAAGGAGGGCAGGAGTGA

(SEQ ID NO: 16)

Figura 9B

Secuencia de ADN de Orip

CCTTTATGTGTAACCTTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCCAGGGGCCAGGAAGACTACGGGAGGCTA
 CACCAACGTCAATCAGAGGGGCCTGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTTATAAGGCCCCCTTG
 TTAACCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGTAGTAGTATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCAATAGCATAATGTTACCCAACG
 GGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCTAAGGAACAGCGATATCTCCCACCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTT
 ACATGGGGTACAGGATCCACGAGGGTAGTGAACATTTTGTAGTACACAAGGGCAGTGGCTGAAGATCAAGGAGCGGGCAGTGAACCTCTCC
 TGAATCTTCGCTGCTTCTTCATTCCTTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAGGTGCTC
 GAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCAGAAATAAAATTTGGACGGGGGTTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCCT
 CACAAACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTTCTGAATATCTTTAACAATAGAAAATCCATGGGGTGGGGACAAGC
 CGTAAAGACTGGATGTCCATCTCACACGAATTTATGGCTATGGCAACACATAATCCTAGTGCATATGATACTGGGGTTATTAAGAT
 GTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCATGTTGTACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACCCGACAGCAGCG
 GACTCCACTGGTTGCTCTAACACCCCCGAAAATTAACGGGGCTCCACGCCAATGGGGCCATAAAACAAGACAAGTGGCCACTCTT
 TTTTTGAAATTTGGAGTGGGGGACGCGTCAGCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGGACTGTAAAATAAGGGTGTAAATAACTTG
 GCTGATTGTAACCCCGCTAACCACTGCGGTCAAACCACCTGCCACAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATACCTGCATAAGTAGG
 TGGGGGGCCAAAGATAGGGGCGGATTGCTGCGATCTGGAGGACAAATACACACACTTGGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTG
 GTCCTCATATTCACGAGGTGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATG
 CTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATA
 TGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTA
 TATGCTATCCTAATCTGATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAATAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAG
 CATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCA
 TAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAG
 CATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGT
 AGCATATGCTATCCTCATGCATATACAGTCAGCATATGATACCCAGTAGTAGTGGGAGTGTCTATCCTTTGCATATGCCGCCACCTC
 CCAAGGGGGCGTGAATTTTCGCTGCTTGTCTTTTCCTGC (SEQ ID NO: 17)

Figura 9C

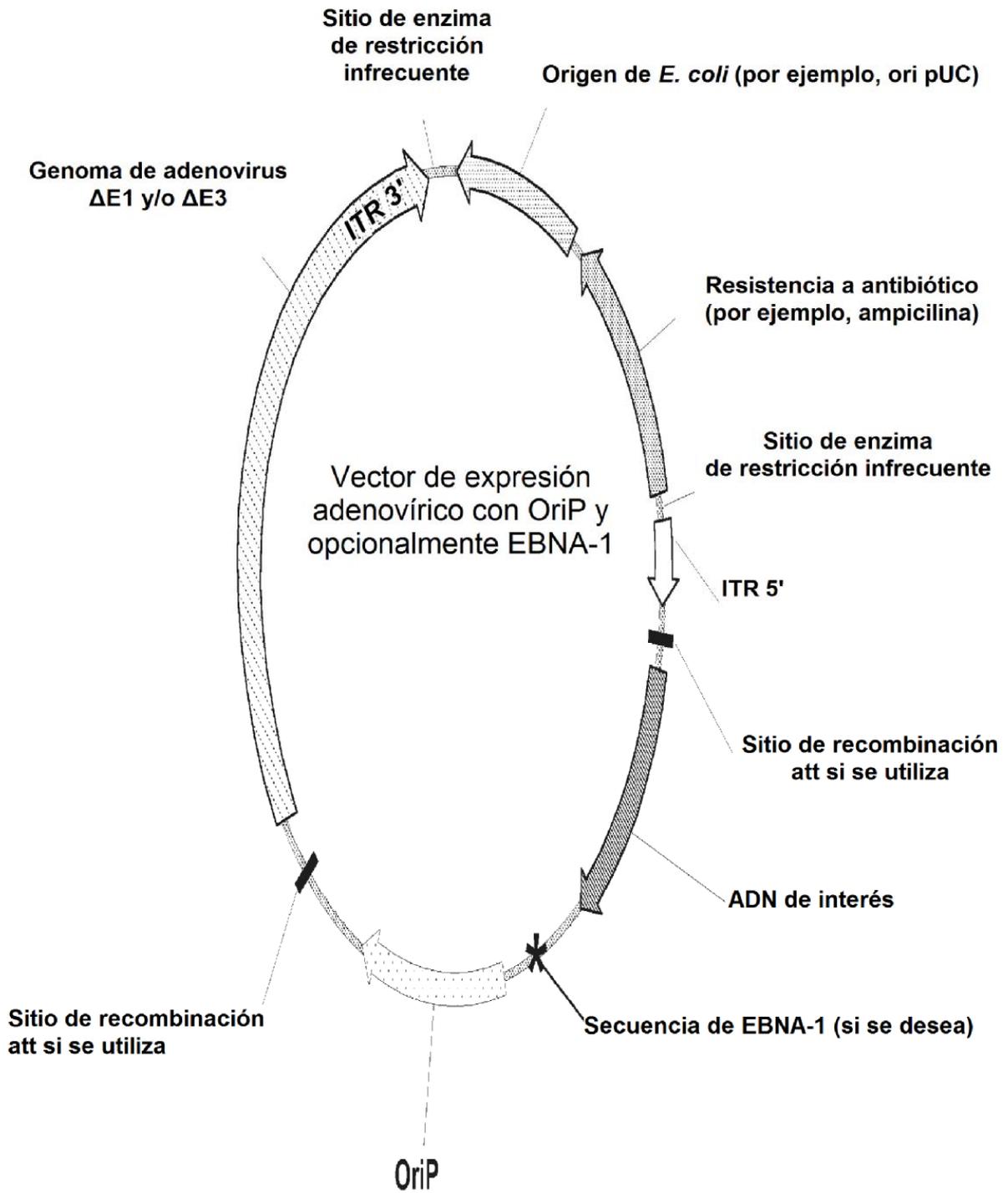


Figura 10

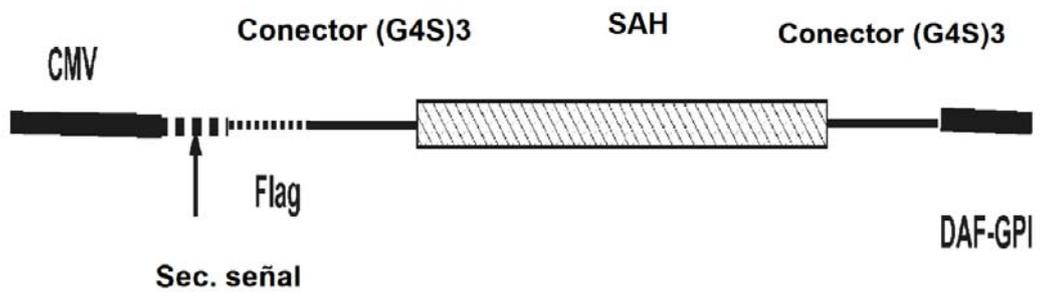


Figura 11A

Anti-SAH

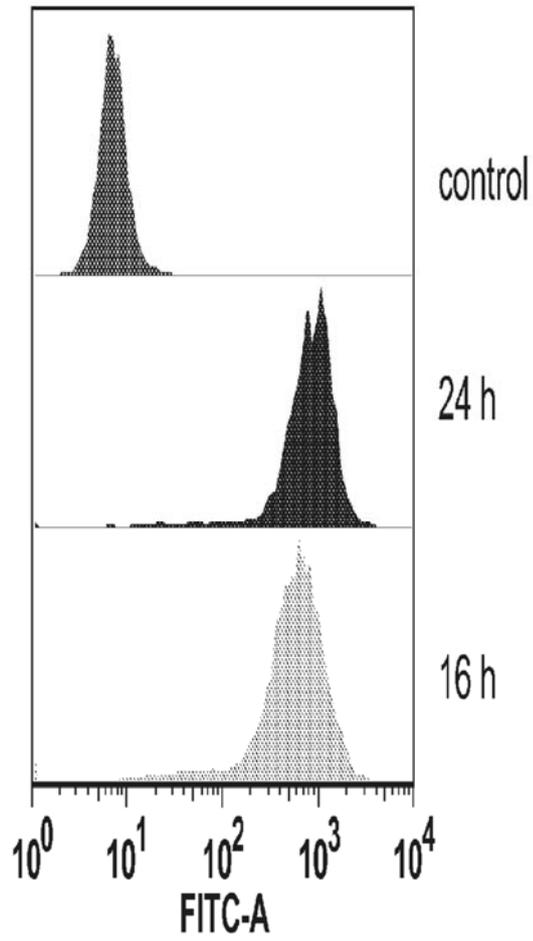


Figura 11B

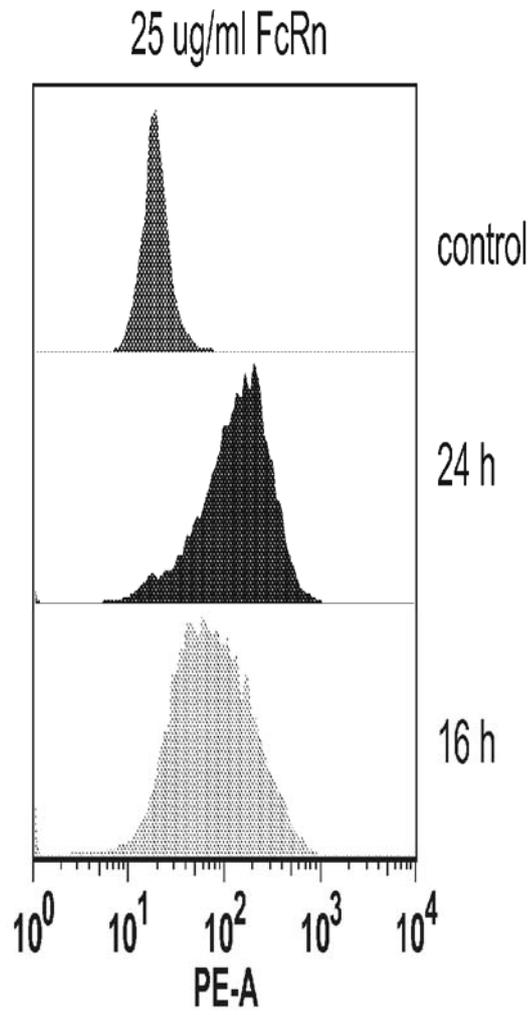


Figura 11C

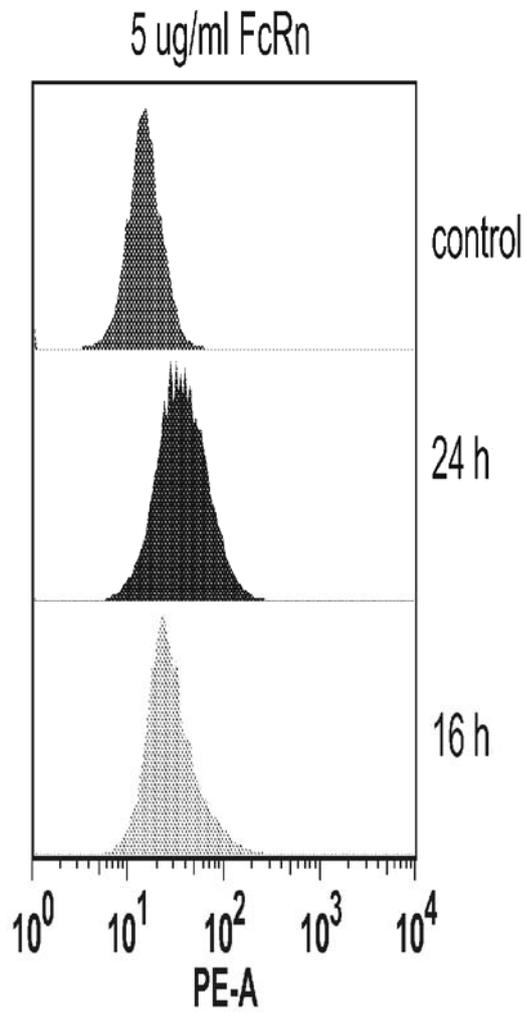


Figura 11D

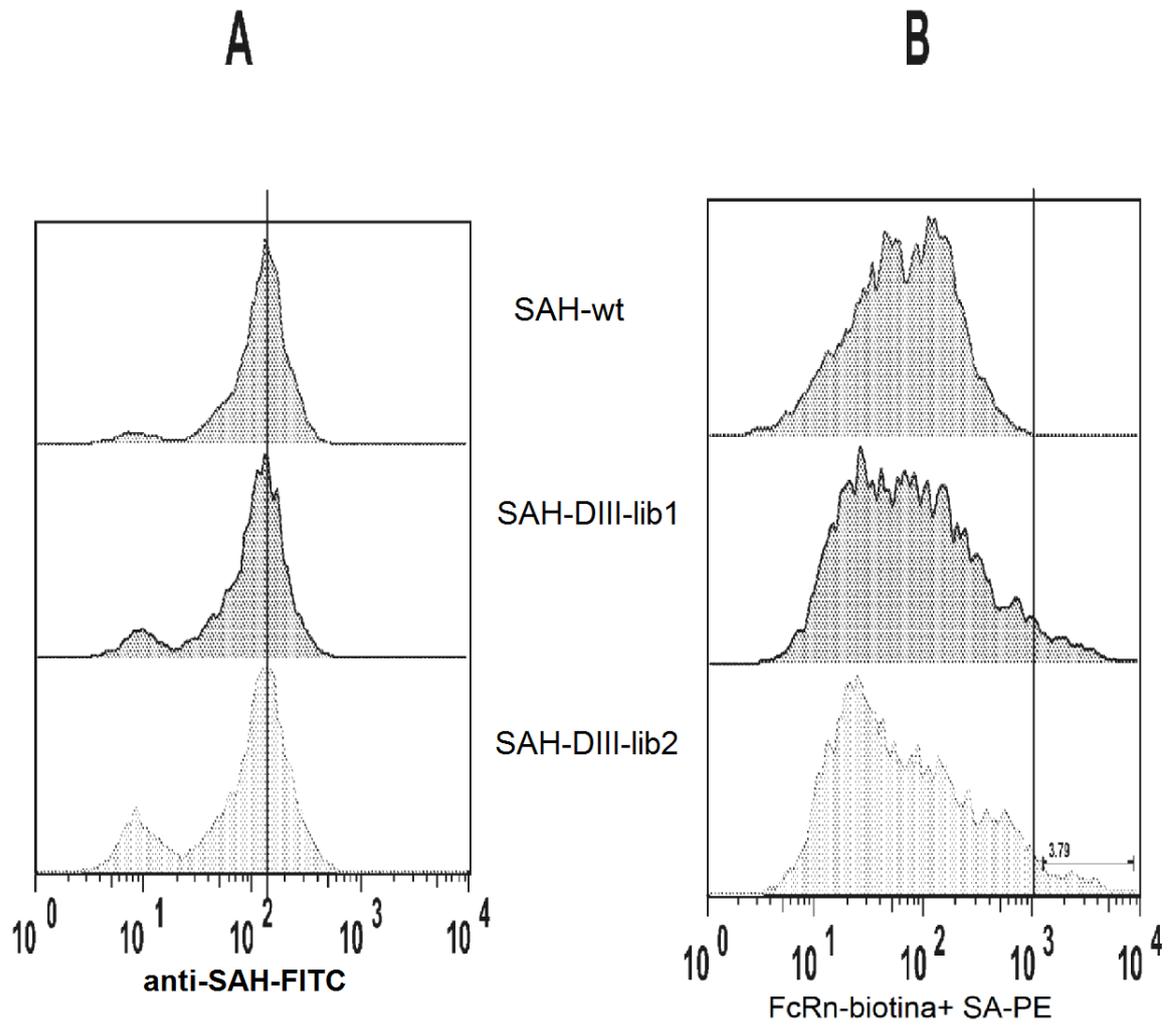


Figura 12

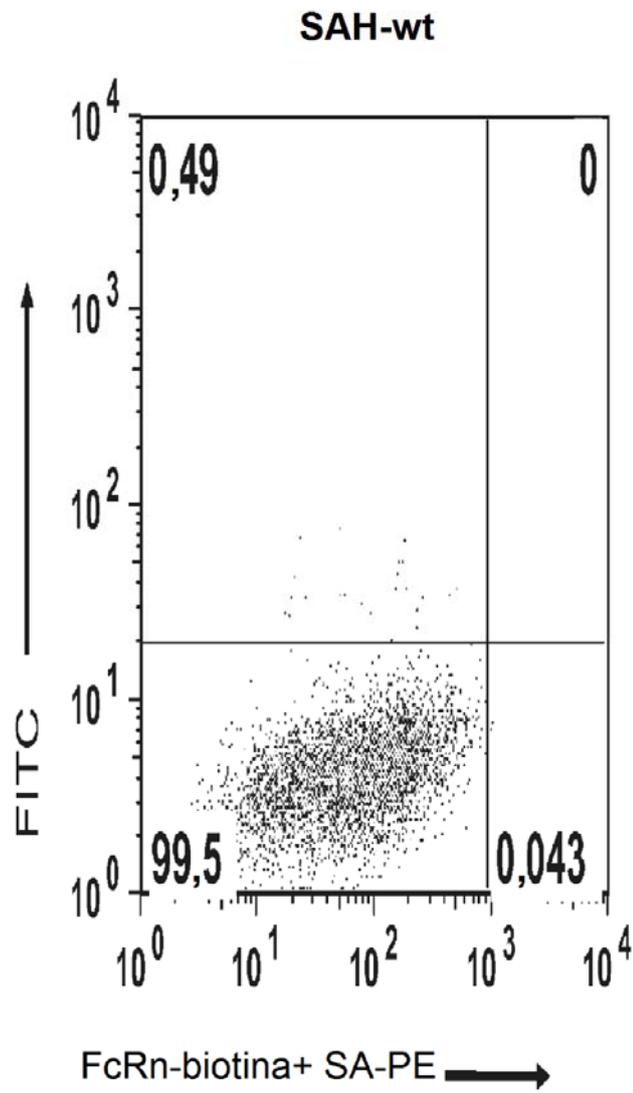


Figura 13A

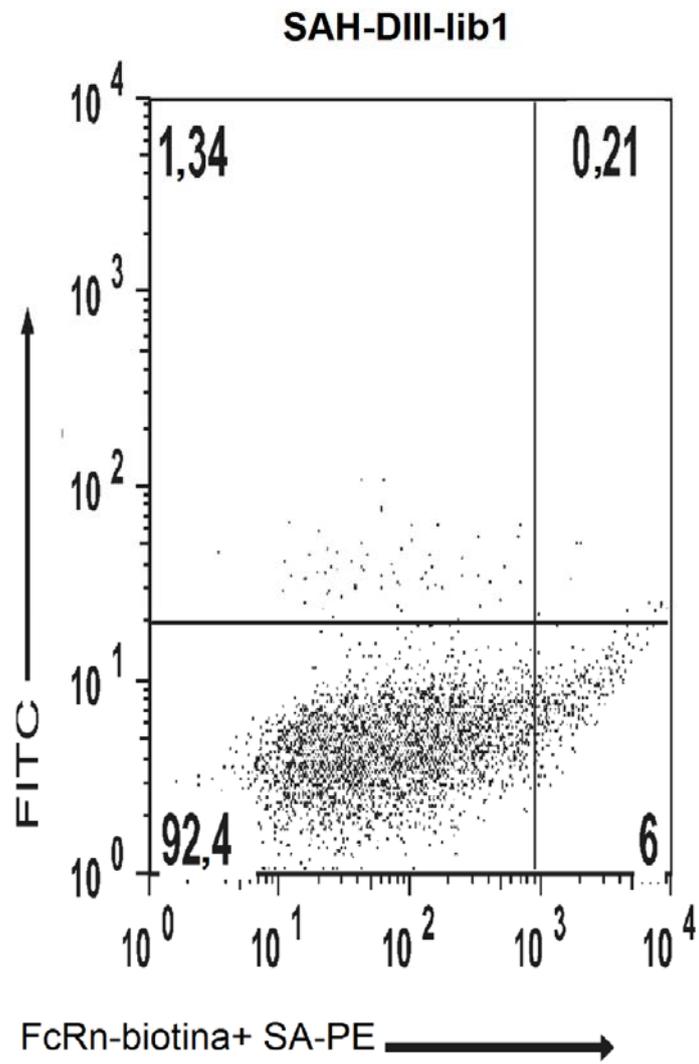


Figura 13B

SAH-DIII-lib2

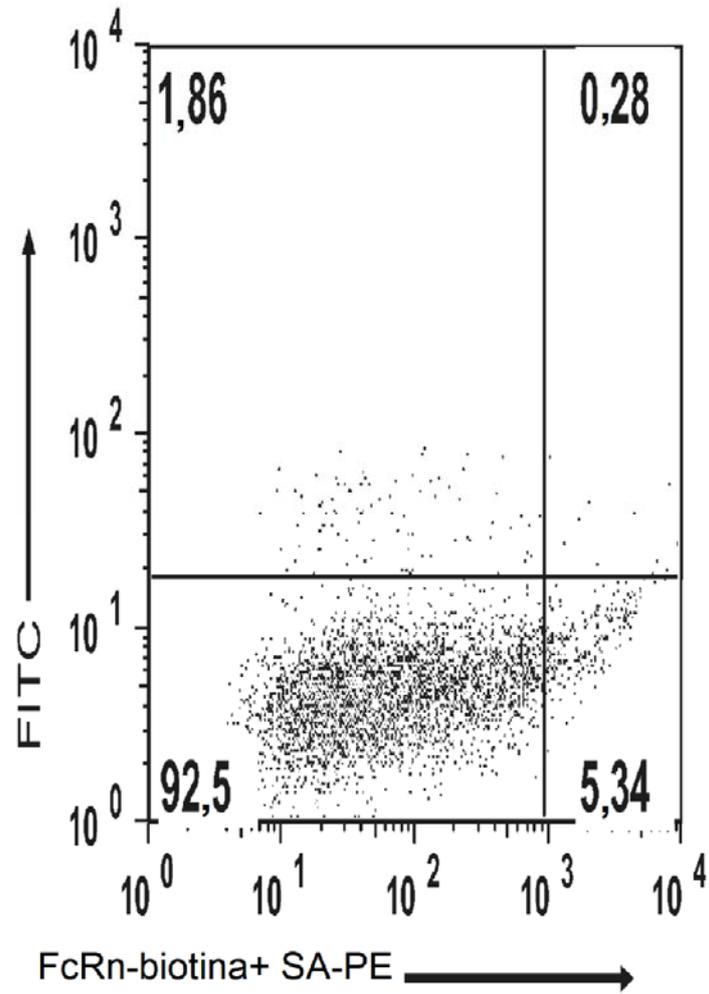


Figura 13C

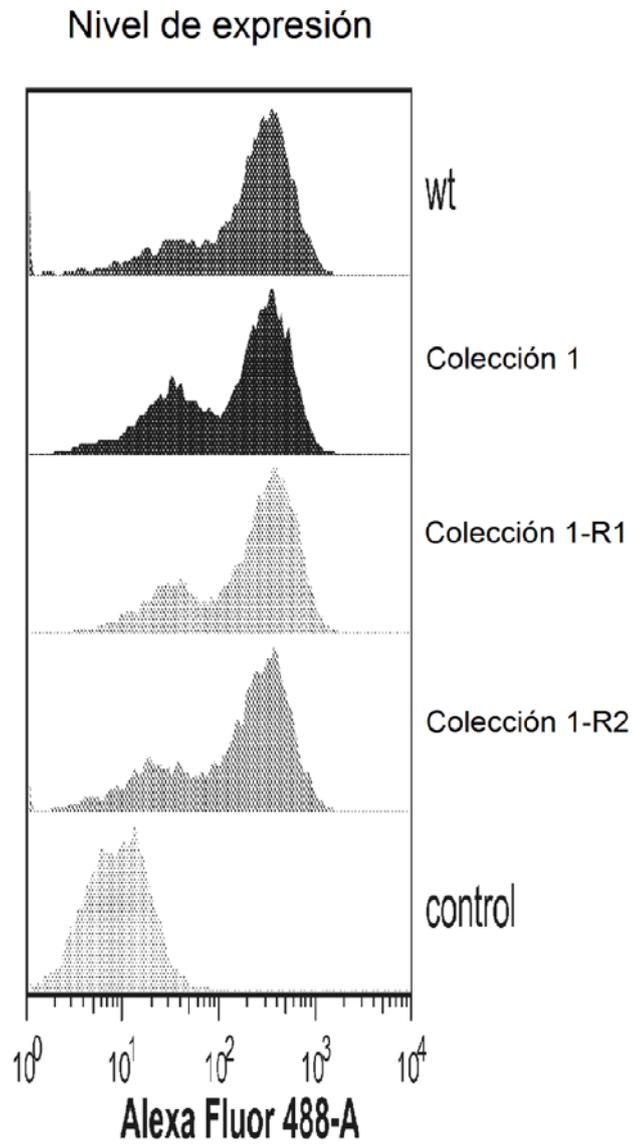


Figura 14A

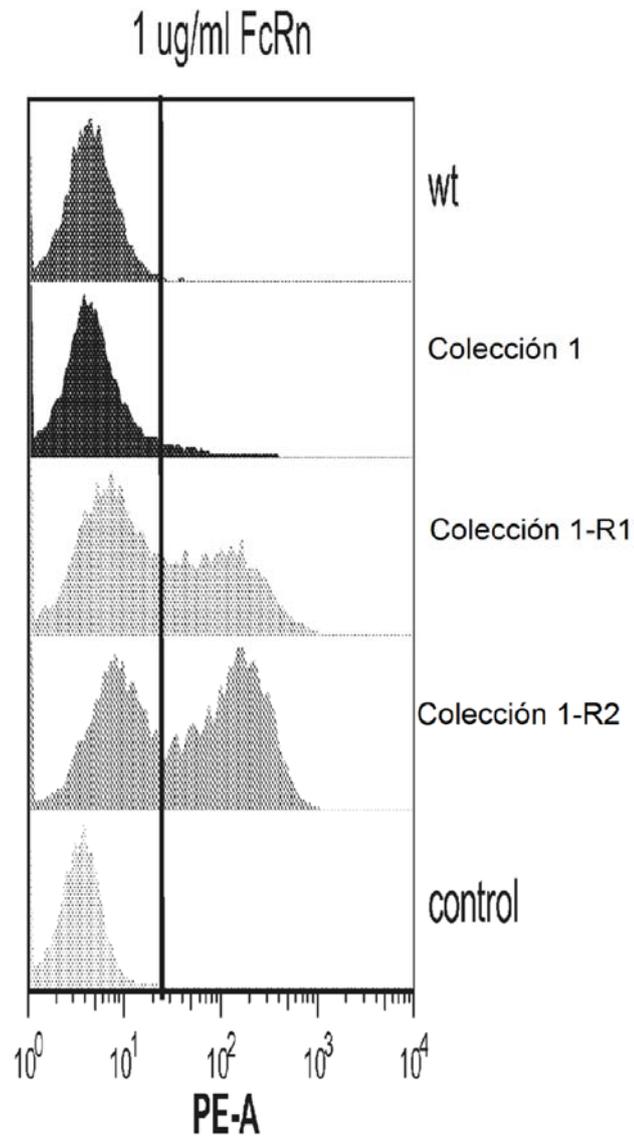


Figura 14B

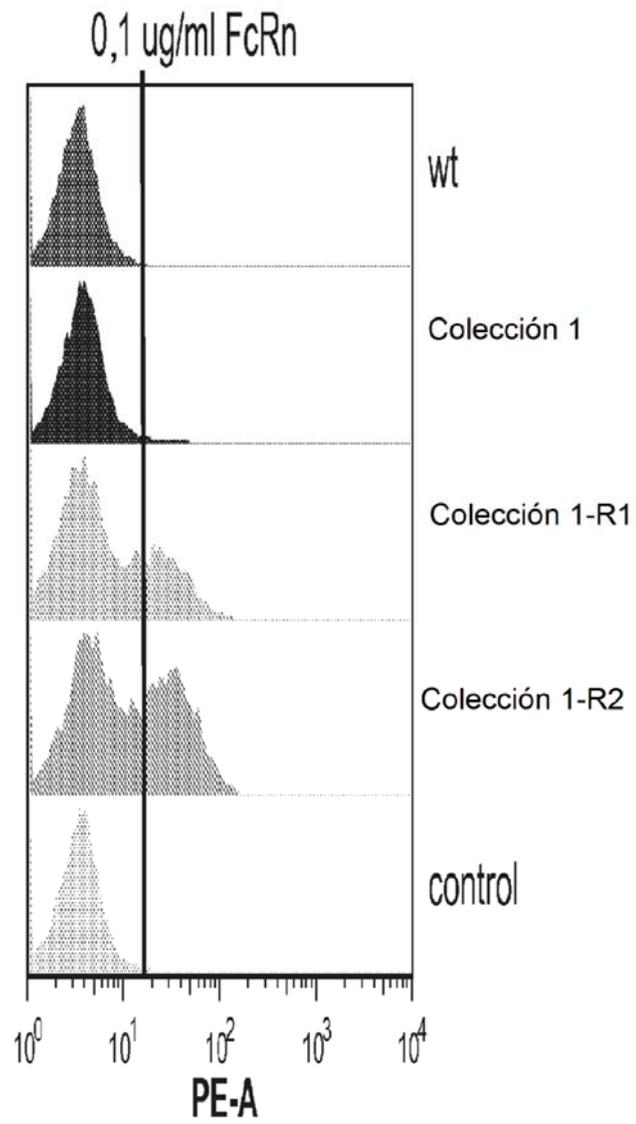


Figura 14C

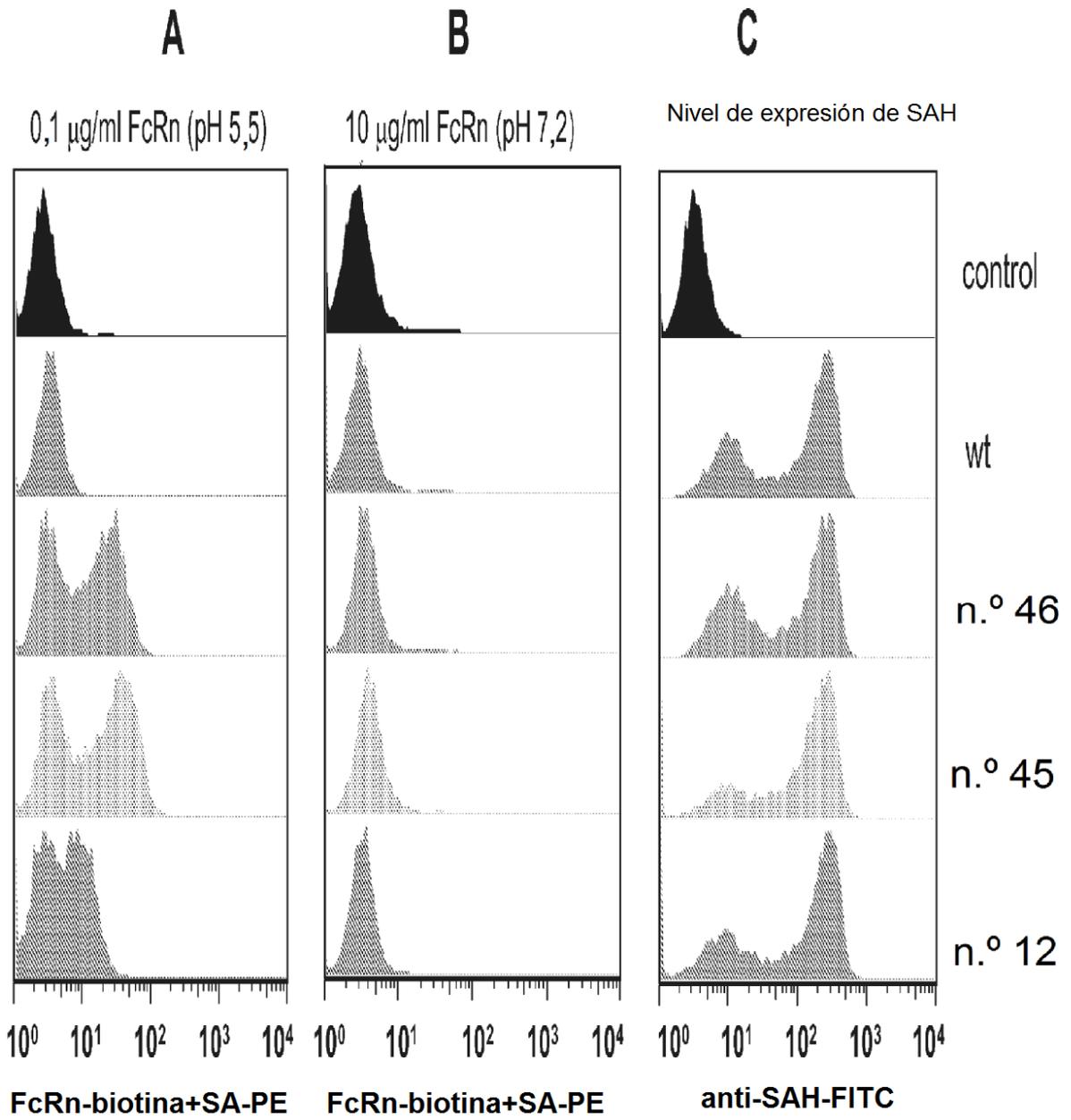


Figura 15

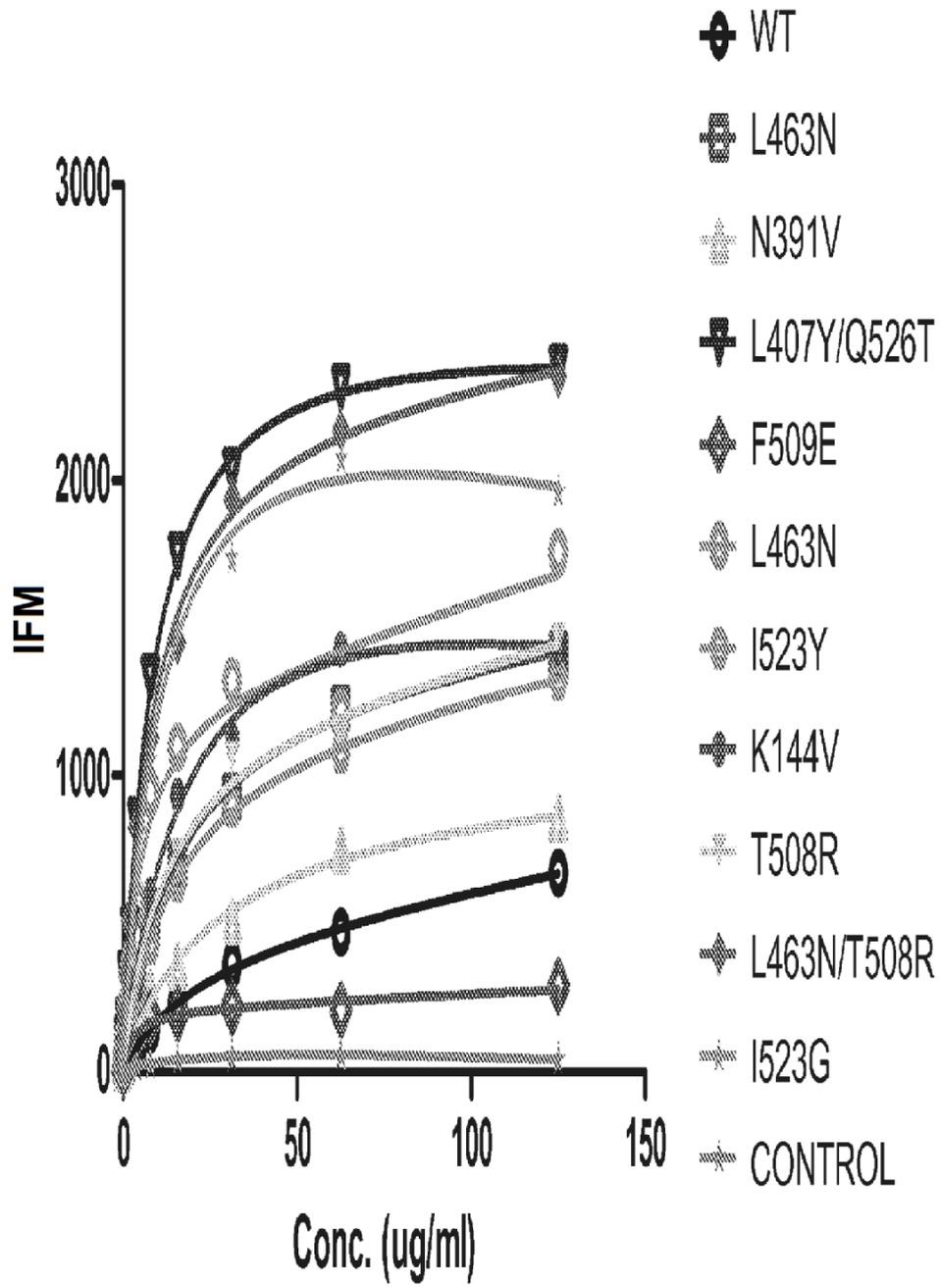


Figura 16

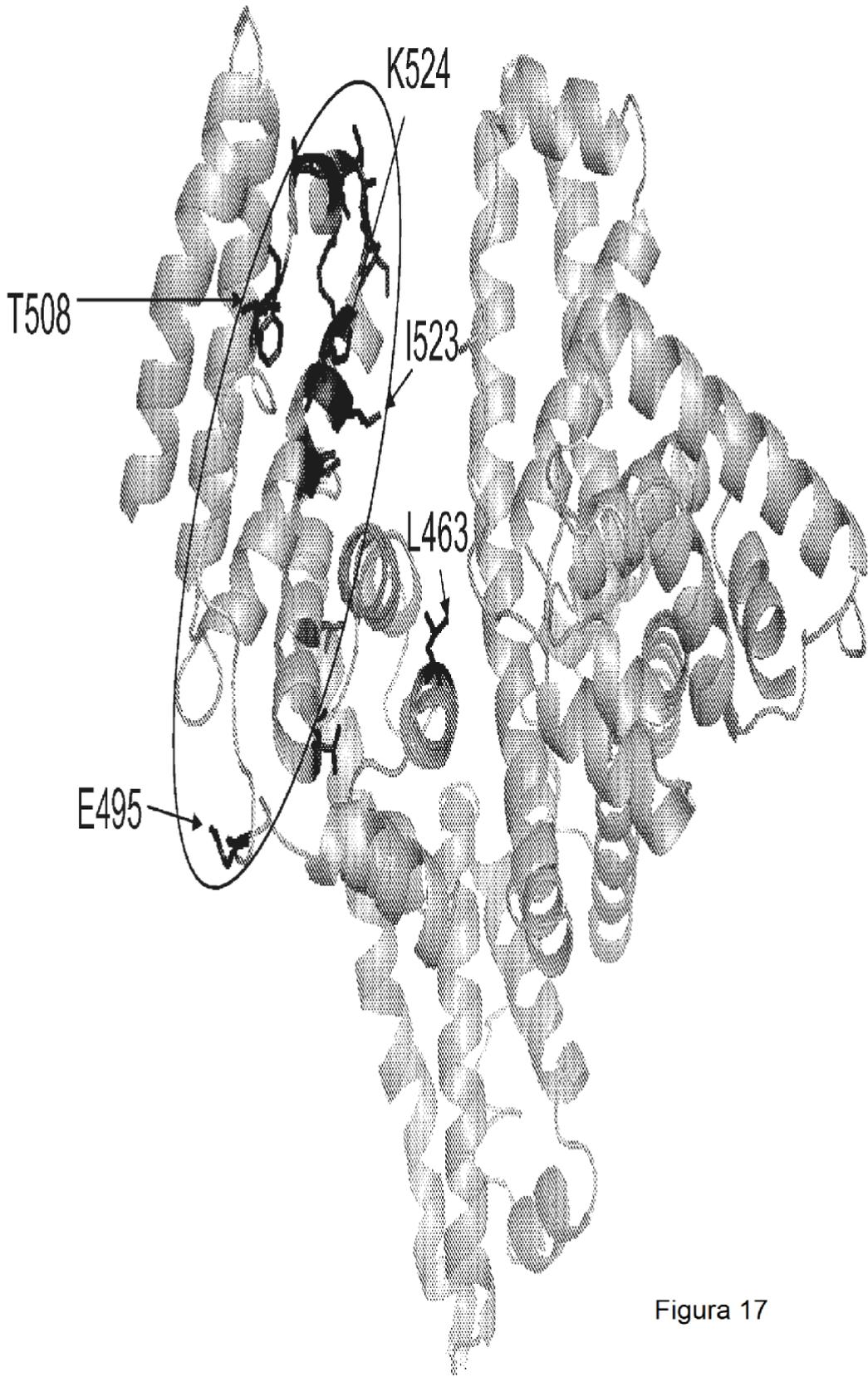


Figura 17