PROTEASAS DE CISTEÍNA

DESCRIPCIÓN

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un nuevo polipéptido que presenta una actividad de proteasa de cisteína IgG, y usos in vivo y ex vivo del mismo. Usos del polipéptido incluyen métodos para la preparación o tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por IgG y métodos para el análisis de IgG.

Antecedente de la invención

La IdeS (enzima de degradación G de inmunoglobulina de S. pyogenes) es una proteasa de cisteína extracelular producida por el patógeno humano S. pyogenes. La IdeS se aisló originalmente de un grupo de cepa de A Streptococcus del serotipo M1, pero el gen ideS se ha identificado ahora en todos los grupos probados de cepas A Streptococcus. La IdeS tiene un grado extraordinariamente alto de especificidad de sustrato, siendo la IgG su único sustrato identificado. La IdeS cataliza una única división proteolítica en la región de bisagra inferior de las cadenas pesadas de todas las subclases de IgG humana. La IdeS también cataliza una división equivalente de las cadenas pesadas de algunas subclases de IgG en diversos animales. La IdeS divide eficientemente la IgG a fragmentos Fc y $F(ab')_2$ a través de un mecanismo de dos etapas. En una primera etapa, se divide una (primera) cadena pesada de IgG para generar una única molécula IgG dividida (scIgG) con una molécula de Fc unida no covalentemente. La molécula scIgG es efectivamente un producto intermedio que retiene el resto de la cadena pesada (segunda) de la molécula IgG original. En la segunda etapa del mecanismo esta segunda cadena pesada se dividid por la IdeS para liberar un fragmento $F(ab')_2$ y un fragmento Fc homodimérico. Estos son productos observados en general bajo condiciones fisiológicas. Bajo condiciones de reducción el fragmento $F(ab')_2$ puede disociar a dos fragmentos Fab y el FC homodimérico lo puede disociar en sus componentes monómeros.

Resumen de la invención

Se ha mostrado que la capacidad de división de IgG de la IdeS tiene utilidad ex vivo, por ejemplo, en métodos para la producción de fragmentos Fab y Fc, que se puede utilizar para el análisis de IgG. Véase, por ejemplo, los documentos WO2003051914 y WO2009033670. También se ha mostrado que la IdeS tiene utilidad in vivo como un agente terapéutico, en razón a que es capaz de la división in vivo de las moléculas de IgG que median la enfermedad o que de otra manera son indeseable. Véase, por ejemplo, los documentos WO2003051914, WO2006131347 y WO2013110946. La IdeS se puede utilizar como una terapia para cualquier enfermedad o afección completamente o parcialmente mediada por la IgG. Muchas enfermedades autoinmunitarias son total o parcialmente mediadas por IgG, como es el rechazo agudo de órganos donados.

Sin embargo, la IdeS es una proteína inmunogénica. Es decir, cuando la IdeS se utiliza como un agente terapéutico, el sistema inmunitario del sujeto que recibe la IdeS frecuentemente responderá a esto. La reacción del sistema inmunitario a la IdeS implicará normalmente la producción de anticuerpos específicos para IdeS. Estos anticuerpos se pueden denominar aquí como anticuerpos antifármacos (ADA) específicos para IdeS o “ADA específicos para IdeS “. La respuesta inmunitaria al IdeS en general y la producción de ADA específico para IdeS en particular, puede provocar dos tipos de problemas relacionados. En primer lugar, la eficacia del IdeS se puede reducir, por ejemplo, debido a unión ADA, que requiere potencialmente mayores dosis o repeticiones de dosis para alcanzar el mismo efecto. El ADA que tiene este efecto se puede denominar como “ADA neutralizante”. En segundo lugar, también puede ser indeseable o incluso presentar complicaciones perjudiciales, tal como respuesta hiperinflamatoria activada por complejos inmunitarios de la ADA e IdeS. Entre mayor es la cantidad de ADA específica para IdeS en un sujeto dado mayor es la probabilidad de que ocurran estos problemas. La presencia y la cantidad de las moléculas ADA específicas para IdeS en un paciente se puede determinar mediante cualquier método adecuado, tal como una prueba CAP FEIA (ImmunoCAP) específico o un ensayo de valoración realizado sobre una muestra de suero del paciente. Por encima de un umbral determinado por el médico, la cantidad de moléculas ADA específicas para IdeS en el paciente puede precluir la administración de IdeS, o indicar que se requieren mayores dosis de IdeS. Dicha mayor dosis puede a su vez resultar en un aumento de la cantidad de moléculas ADA específicas para IdeS en el paciente, precluyendo por lo tanto la administración adicional de IdeS.

La IdeS es un factor de virulencia de S. pyogenes, que es responsable de infecciones comunes como amigdalitis y estreptococos. De acuerdo con lo anterior la mayoría se sujetos humanos han encontrado la IdeS en este contexto y probablemente tienen anticuerpos anti-IdeS en el torrente sanguíneo. La ADA específica para IdeS se detecta rutinariamente en muestras de suero de sujetos humanos aleatorios (probablemente debido a previas infecciones estreptocócicas), así como en preparaciones IVIg (Inmunoglobulina Intravenosa), que son preparaciones de IgG extraídas de suero agrupado de miles de donantes. Incluso si un sujeto no posee la ADA específica para IdeS antes de la una administración inicial de IdeS, es probable que dichas moléculas se produzcan posteriormente. De esta manera, para un sujeto dado, los problemas asociados con la inmunogenicidad de la IdeS probablemente presentan una barrera para el uso de IdeS como un tratamiento. Estos problemas requieren el aumento de la dosis de IdeS y/o la preclusión

del tratamiento con IdeS completamente, particularmente si se requieren repeticiones de administración. Los métodos existentes para los problemas de este tipo implican, por ejemplo, PEGilación de un agente terapéutico para reducir la inmunogenicidad o coadministración del agente terapéutico con un agente inmunosupresor.

Los presentes inventores han adoptado un método completamente diferente. Los inventores analizaron la secuencia de la IdeS y la compararon con la secuencia de la proteína IdeZ, que tiene aproximadamente 66% de identidad con IdeS. La IdeZ es una proteasa de cisteína IgG producida por Streptococcus equi SSP. zooepidemicus, una bacteria encontrada predominantemente en caballos. Como la IdeZ no es un patógeno humano, los sujetos humanos normalmente no tienen anticuerpos contra esta proteína en su plasma. Sin embargo, la IdeZ tiene un nivel de actividad de proteasa de cisteína IgG contra IgG humano que es considerablemente menor que aquel de IdeS. Los presentes inventores investigaron posiciones en que la secuencia de IdeZ que mejoran su actividad contra IgG humano sin resultar en un aumento significativo en inmunogenicidad. En los puntos de partida para esta investigación, los inventores utilizaron tanto la secuencia de IdeZ como la secuencia de una secuencia híbrida novedosa diseñada por los inventores, que tiene 81.7% de identidad con IdeS y 81% de identidad con IdeZ. Esta secuencia híbrida se puede denominar aquí como IdeS/Z.

La secuencia completa de la IdeS está públicamente disponible como la secuencia de referencia NCBI no. WP_010922160.1 y se proporciona aquí como la SEQ ID NO: 1. esta secuencia incluye una metionina de terminal N seguida por una secuencia de señal de secreción de 28 aminoácidos. La metionina de terminal N y la secuencia de señal (un total de 29 aminoácidos en el terminal N) se retiran normalmente para formar la proteína IdeS madura, cuya secuencia está públicamente disponible con el número de acceso Genbank no. ADF13949.1 y se proporciona aquí como la SEQ ID NO: 2.

La secuencia completa de la IdeZ está públicamente disponible como la secuencia de referencia NCBI no WP_014622780.1, y se proporciona aquí como la SEQ ID NO: 3. esta secuencia incluye una metionina de terminal N seguida por una secuencia de señal de secreción de 33 aminoácidos. La metionina de terminal N y la secuencia de señal (un total de 34 aminoácidos en el terminal N) se retiran normalmente para formar la proteína IdeZ madura, cuya secuencia se proporciona aquí como la SEQ ID NO: 4.

La secuencia de la IdeS/Z híbrida diseñada por los inventores tiene una parte de terminal N basada en IdeZ, sin la metionina de terminal N ni la secuencia señal (un total de 34 aminoácidos en el terminal N). Esta secuencia se proporciona aquí como la SEQ ID NO: 5.

Los presentes inventores han sido capaces de identificar posiciones dentro de la secuencia de IdeZ e IdeS/Z híbrida que, que cuando se modifica como se describe aquí, conduce a polipéptidos nuevos que tienen aumento de actividad de proteasa de cisteína IgG contra IgG humana en relativa a IdeZ. La actividad de proteasa de cisteína IgG contra IgG humano de un polipéptido de la invención es preferiblemente por lo menos tan alta como la actividad de proteasa de cisteína IgG contra IgG humano de IdeS. Un polipéptido de la invención puede ser más eficaz en dividir la primera cadena de una molécula IgG que la segunda cadena (véase representación esquemática en la figura 18), particularmente cuando la IgG es un isotipo IgG2. Un polipéptido de la invención puede ser más efectivo en dividir el IgG1 que IgG2. El polipéptido de la invención es normalmente menos inmunogénico que el IdeS y puede preferiblemente ser no más inmunogénico que la IdeZ o IdeS/Z.

A menos que se indique otra cosa, todas las referencias a la numeración de las posiciones de aminoácidos en los polipéptidos descritos aquí se basan en la numeración de las posiciones correspondientes en la SEQ ID NO: 3, partiendo del terminal N. De esta manera, en razón a que las SEQ ID NO: 4 y 5 carecen de la metionina terminal N y la secuencia de señal de 33 aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, el residuo de ácido aspártico (D) en el terminal N de la SEQ ID NO: 4 y 5 se refiere en cuanto a la posición 35 ya que esta es la posición correspondiente en la SEQ ID NO: 3. Aplicar este esquema de numeración, el residuo más crítico para la actividad de la proteasa de cisteína IgG de la IdeS es la cisteína (C) en la posición 102 (residuo 68 del terminal N de la SEQ ID NOs: 4 y 5). Probablemente otros residuos sean importantes para la actividad de proteasa de cisteína IgG son lisina (K) en la posición 92, histidina (H) en la posición 272 y ácido aspártico (D) en cada una de las posiciones 294 y 296 de la SEQ ID NO: 3. Estos son residuos 58, 238, 260 y 262 del terminal N de la SEQ ID NO: 4 y 58, 236, 258 y 260 del terminal N de la SEQ ID NO: 5, respectivamente.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona de esta manera un polipéptido que tiene actividad de proteasa de cisteína IgG y que comprende una variante de la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o 5, cuya variante:

(a) es por lo menos 50% idéntica a la SEQ ID NO: 4 o 5;

(b) tiene una cisteína (C) en la posición en dicha secuencia variante que corresponde a la posición 102 de la SEQ ID NO: 3; y, opcionalmente,

(c) tiene, en las posiciones en dicha secuencia variante que corresponden a las posiciones 92, 272, 294 y 296 de la SEQ ID NO: 3, una lisina (K), una histidina (H), un ácido aspártico (D) y un ácido aspártico (D), respectivamente;

en el que dicho polipéptido es más efectivo en dividir la IgG humana que la IdeZ y/o es por lo menos tan efectivo en la división de la IgG humana como la IdeS.

Preferiblemente, dicha variante de la SEQ ID NO: 4 o 5:

(1) tiene un aminoácido cargado positivamente en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 138 de la SEQ ID NO: 3, opcionalmente en el que dicho aminoácido cargado positivamente es arginina (R) o lisina (K); y/o

(2) tiene un aminoácido cargado positivamente en la posición en dicha variante dijo que corresponde a la posición 139 de la SEQ ID NO: 3, opcionalmente en el que dicho aminoácido cargado positivamente es arginina (R) o lisina (K); y/o

(3) no incluye las secuencias contiguas DDYQRNATEA YAKEVPHQIT; y/o

(4) tiene por lo menos una de las siguientes modificaciones:

i. una eliminación de los residuos leucina (L) y treonina (T) en las posiciones en dicha variante que corresponde a las posiciones 64 y 65 de la SEQ ID NO: 3;

ii. una treonina (T) en lugar de la arginina (R) en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 70 de la SEQ ID NO: 3;

iii. una eliminación de la tirosina (Y) en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 71 de la SEQ ID NO: 3;

iv. una glutamina (Q) en lugar de la asparagina (N) en la posición de dicha variante que corresponde a la posición 72 de la SEQ ID NO: 3;

v. una glicina (G) en lugar de la asparagina (N) en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 73 de la SEQ ID NO: 3;

vi. una alanina (A) en lugar del ácido glutámico (E) en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 67 de la SEQ ID NO: 3;

vii. una asparagina (N) en lugar de glutamina (Q) en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 68 de la SEQ ID NO: 3.

Por lo menos una modificación de (4) se selecciona normalmente de las opciones i. a vii. anteriores. Un polipéptido de la invención puede comprender una variante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o 5, cuya variante tiene por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis o los todas las siete modificaciones de opciones i. a vii.

La invención también proporciona un Polinucleótido, un vector de expresión o una célula anfitriona que codifica o expresa un polipéptido de la invención.

La invención también proporciona un método para tratar o evitar una enfermedad o afección mediada por anticuerpos IgG en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de un polipéptido de la invención. El método puede comprender normalmente múltiples administraciones de dicho polipéptido al sujeto.

La invención también proporciona un método para tratamiento ex vivo, sangre tomada de un paciente, normalmente un paciente que sufre de una enfermedad o afección mediada por anticuerpos IgG, cuyo método comprende poner en contacto la sangre con un polipéptido de la invención.

La invención también proporciona un método para mejorar el beneficio a un sujeto de una terapia o agente terapéutico, el método comprende (a) administrar al sujeto un polipéptido de la invención; (b) administrar posteriormente dicha terapia o dicho a agente terapéutico al sujeto; en el que:

- dicha terapia es un trasplante de órgano o dicho agente terapéutico es un anticuerpo, una terapia génica tal como un vector vírico, un reemplazo por un factor endógeno defectuoso tal como una enzima, un factor de crecimiento o un factor de coagulación, o una terapia celular;

- la cantidad de dicho polipéptido administrado es suficiente para dividir substancialmente todas las moléculas IgG presentes en el plasma del sujeto; y

- las etapas (a) y (b) se separan mediante un intervalo de tiempo que suficiente para dividir substancialmente todas las moléculas IgG presentes en el plasma del sujeto.

También la invención proporciona un método para generar fragmentos Fc, Fab o $F(ab')_2$ de IgG que comprende poner en contacto IgG con un polipéptido de la invención, preferiblemente ex vivo.

También se proporcionan equipos para llevar a cabo los métodos de acuerdo con la invención.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1 y 2 muestran los resultados de un ensayo representativo para determinar la potencia (eficacia en la división de IgG) de polipéptidos de la invención en comparación con controles.

La figura 3 muestra los resultados de un gel SDS-PAGE representativo utilizado para visualizar los productos de división producidos mediante incubación de IgG1 con polipéptidos de la invención o controles.

La figura 4 muestra los resultados de un gel de SDS-PAGE representativo utilizado para visualizar los productos de división producidos por incubación de IgIV con polipéptidos de la invención o controles.

La figura 5 muestra los resultados de un gel SDS-PAGE representativo para visualizar los productos de división producidos mediante la incubación de IgG1 con polipéptidos adicionales de la invención o controles.

La figura 6 muestra los resultados de un gel SDS-PAGE representativo utilizado para visualizar los productos de división producidos mediante incubación de IgG2 con polipéptidos de la invención o controles.

La figura 7 muestra los resultados de un gel de SDS-PAGE representativo utilizado para visualizar los productos de división producidos mediante incubación de IgIV con polipéptidos de la invención o controles.

Las figuras 8 y 9 muestran los resultados de ensayos de competición representativos para determinar el nivel de reconocimiento de polipéptidos de la invención mediante anticuerpos específicos para IdeS, cuando se compara con controles.

Las figuras 10 y 11 muestran los resultados de ensayos de valoración representativos para determinar el nivel de reconocimiento de polipéptidos de la invención mediante anticuerpos específicos para IdeS, cuando se compara con controles.

La figura 12 muestra curvas de valoración representativas para división de IgG1 mediante diferentes polipéptidos de proteasa de cisteína IgG.

La figura 13 muestra curvas de valoración representativas para división de IgG2 mediante diferentes polipéptidos de proteasa de cisteína IgG.

La figura 14 muestra el resultado de un SDS-PAGE representativo para visualizar los productos de división producidos mediante incubación IgG con polipéptidos de la invención o controles.

La figura 15 muestra el resultado de SDS-PAGE representativo utilizado para visualizar los productos de división producidos mediante incubación de IgG con polipéptidos de la invención o controles.

La figura 16 muestra los resultados de un SDS-PAGE representativo utilizado para visualizar los productos de división producidos mediante incubación de IVIg con polipéptidos de la invención o controles.

La figura 17 muestra los resultados de un SDS-PAGE representativo utilizado para visualizar los productos de división producidos mediante incubación de IVIg con polipéptidos de la invención o controles.

La figura 18 es una representación esquemática de la división de inmunoglobulinas por polipéptidos de la invención.

La figura 19 muestra el resultado de un % representativo de competición de sitios de unión ADA con polipéptidos de la invención o controles.

La figura 20 muestra los resultados de un % representativo adicional de competición de sitios de unión ADA con polipéptidos de la invención o controles.

La figura 21 muestra los resultados de un ELISA de eficacia representativa utilizada para determinar la eficacia de los polipéptidos de la invención en división de IgG humano in vivo.

La figura 22 muestra los resultados de un SDS-PAGE representativo para visualizar los productos de división IgG producidos in vivo mediante polipéptidos de la invención.

Breve descripción de las secuencias

SEQ ID NO: 1 es la secuencia completa de IdeS que incluye metionina de terminal N y secuencia de señal. También se divulga como la secuencia de referencia NCBI No. WP_010922160.1

SEQ ID NO: 2 es la secuencia madura de IdeS, carece de metionina de terminal N y secuencia de señal. También se divulga como el número de acceso Genbank ADF13949.1

SEQ ID NO: 3 es la secuencia completa de la IdeZ que incluye metionina de terminal N y secuencia de señal. También se divulga como la secuencia de referencia NCBI no. WP_014622780.1.

SEQ ID NO: 4 es la secuencia madura de IdeZ, que carece de metionina de terminal N y señal de secuencia.

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de un IdeS/Z híbrida diseñada por los inventores. El terminal N se basa en IdeZ que carece de metionina de terminal N y secuencia de señal.

SEQ ID NO: 6 a 25 son las secuencias de polipéptidos de ejemplos de la invención

SEQ ID NO: 26 es la secuencia de un polipéptido IdeS utilizado aquí como un control. Comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 con una metionina de terminal N adicional y un marcador histidina (referencia interna pCART124).

SEQ ID NO: 27 es la secuencia de un polipéptido IdeZ utilizado aquí como un control. Comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 4 con una metionina de terminal N adicional y un marcador histidina (referencia interna pCART144).

SEQ ID NO: 28 es la secuencia de polipéptidos IdeS/Z utilizada aquí como un control. Comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 5 con una metionina de terminal N adicional y un marcador histidina (referencia interna pCART145).

SEQ ID NO: 29 es la secuencia contigua PLTPEQFRYNN, que corresponde a las posiciones 63-73 de la SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 30 es la secuencia contigua PPANFTQG, que corresponde a las posiciones 58-65 de la SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 31 es la secuencia contigua DDYQRNATEAYAKEVPHQIT, que corresponde a las posiciones 35-54 de la SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 32 es la secuencia contigua DSFSANQEIRYSEVTPYHVT, que corresponde a las posiciones 30-49 de la SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NOs: 33 a 55 son secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos divulgados aquí.

Descripción detallada de la invención

Se debe entender que las diferentes aplicaciones de los productos divulgados y los métodos se pueden adaptar a las necesidades específicas en la técnica. También se debe entender que la terminología utilizada aquí tiene el propósito de describir realizaciones particulares de la invención únicamente, y no pretende ser limitante.

Adicionalmente como se utiliza en esta especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “uno” y “la” incluyen referentes plurales a menos que el contenido indique claramente otra cosa. De esta manera, por ejemplo, la referencia a “un polipéptido” incluye “polipéptidos”, y similares.

Un “polipéptido” se utiliza aquí en su sentido más amplio para referirse a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácidos, u otros peptidomiméticos. El término “polipéptido” incluye adicionalmente secuencias cortas de péptidos y también péptidos mayores y proteínas. Como se utiliza aquí, el término “aminoácidos” se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, que incluyen ambos isómeros ópticos D o L, y aminoácidos análogos y peptidomiméticos.

Los términos “paciente” y “sujeto” se utilizan intercambiablemente y se refieren normalmente a un ser humano. Las referencias a IgG normalmente se refieren a IgG humano a menos que se indique otra cosa.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas aquí, ya sea atrás o adelante, se incorporan aquí mediante referencia en su totalidad.

Características funcionales de los polipéptidos

La presente invención se refiere a un polipéptido novedoso que tiene actividad de proteasa de cisteína IgG, en el que dicho polipéptido es más efectivo en dividir el IgG humano que el IdeZ. La actividad de proteasa de cisteína IgG contra IgG humano de un polipéptido de la invención es preferiblemente por lo menos tan alta como la actividad de proteasa de

cisteína IgG contra IgG humano de IdeS. Adicionalmente el polipéptido de la invención normalmente es menos inmunogénico que IdeS y preferiblemente puede ser más inmunogénico que el IdeZ o IdeS/Z. En el contexto de un control o una comparación relativa a un polipéptido de la invención, “IdeS”, “IdeZ” y “IdeS/Z” se refiere a un polipéptido que consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, 4 y 5, respectivamente. Alternativamente, o adicionalmente, “IdeS”, “IdeZ” y “IdeS/Z” cuando se utiliza como un control o una comparación se puede referir a un polipéptido que comprende la secuencia de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, 4 y 5, respectivamente, con un residuo metionina (M) adicional en el terminal N y/o un marcador en el terminal C para ayudar con la expresión en y aislamiento de los sistemas de expresión bacterianos estándar. Las etiquetas adecuadas incluyen un marcador histidina que se puede unir directamente al terminal C de un polipéptido o unir indirectamente mediante cualquier secuencia ligadora adecuada, tal como los residuos glicina 3, 4 o 5. La etiqueta histidina normalmente consiste de seis residuos histidina, aunque pueden ser más de esto, normalmente hasta 7, 8, 9, 10 o 20 aminoácidos o menos, por ejemplo 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácidos. La secuencia de un polipéptido IdeS de ejemplo utilizado aquí es un control que se proporciona como la SEQ ID NO: 22. Este polipéptido comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 con una metionina de terminal N adicional y un marcador histidina y se puede denominar aquí como pCART124. La secuencia de un polipéptido IdeZ de ejemplo utilizado aquí es un control que se proporciona como la SEQ ID NO: 23. Este polipéptido comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 4 con una metionina de terminal N adicional y un marcador histidina y se puede denominar aquí como pCART144. La secuencia de un polipéptido IdeS/Z de ejemplo utilizado aquí es un control que se proporciona como la SEQ ID NO: 24. Este polipéptido comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 5 con una metionina de terminal N adicional y un marcador histidina y se puede denominar aquí como pCART145.

La actividad de proteasa de cisteína IgG se puede evaluar mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, al incubar un polipéptido con una muestra que contiene IgG y determinar la presencia de productos de división IgG. La eficacia se puede evaluar en la presencia o ausencia de un inhibidor, tal como un anticuerpo neutralizante. Sin embargo, la eficacia aquí normalmente significará la eficacia que se evalúa en la ausencia de dicho un inhibidor a menos que se indique otra cosa. Los métodos adecuados se describen en lo ejemplos. La eficacia de un polipéptido en la división de IgG se puede denominar aquí como la “potencia” del polipéptido. La potencia de un polipéptido de la invención es preferiblemente por lo menos 2.0 veces mayor que la potencia del IdeZ medido en el mismo ensayo. Alternativamente, la potencia de un polipéptido de la invención es preferiblemente por lo menos equivalente a la potencia del IdeS medido en el mismo ensayo. La potencia de un polipéptido de la invención puede ser por lo menos 1,5 veces, 2.0 veces, 2.5 veces, 3.0 veces, 4.0 veces, 4.5 veces, 5.0 veces, 6.0 veces, 7.0 veces, 7.5 veces o 8.0 veces mayor que la potencia del IdeS medido en el mismo ensayo. La potencia de un polipéptido de la invención es preferiblemente por lo menos 2.0 veces, más preferiblemente por lo menos 3.0 o 4.0 veces y más preferiblemente por lo menos 8.0 veces mayor que la potencia de IdeS medida en el mismo ensayo.

El polipéptido de la invención normalmente es menos inmunogénico que el IdeS y de esta manera aumenta la potencia relativa para ese del IdeZ y/o la potencia equivalente para ese del IdeS es un estándar mínimo aceptable para actividad de proteasa de cisteína contra IgG humano. Sin embargo, el aumento de la potencia relativa para IdeS es una mejora deseable. Dicho aumento de potencia permitirá normalmente el uso de menores dosis de un polipéptido de la invención para el mismo efecto terapéutico que una mayor dosis de IdeS. La menor dosis también puede permitir un mayor número de administraciones repetidas de un polipéptido de la invención relativo a IdeS. Esto se debe a que el uso de menores dosis reduce los problemas asociados con la inmunogenicidad de un agente terapéutico, en razón a que el sistema inmunitario probablemente responde menos, o responderá menos vigorosamente, a un agente que está presente en una menor concentración.

Los ensayos para evaluar la eficacia del polipéptido en la división de IgG, es decir los ensayos para evaluar la potencia de un polipéptido, son bien conocidos en la técnica y se puede utilizar cualquier ensayo adecuado. Los ensayos adecuados incluyen ensayos basados en ELISA, tal como se describe en los ejemplos. En dicho un ensayo, los pozos de una placa de ensayo normalmente se cubrirá con un anticuerpo objetivo, tal como albúmina de suero de bovino (BSA). Las muestras del polipéptido que se va a ensayar se pegan luego a los pozos, seguido por muestras de anticuerpos objetivo es un anticuerpo específico para BSA en este ejemplo. El polipéptido y el anticuerpo se les permite interactuar bajo condiciones adecuadas para actividad de proteasa de cisteína IgG. Después de un intervalo adecuado, la placa de ensayo se lavará y se agregará un anticuerpo detector que se une específicamente a un anticuerpo específico objetivo bajo condiciones adecuadas para unirse al anticuerpo específico objetivo. El anticuerpo detector se unirá a cualquier anticuerpo específico objetivo intacto que se halla unido al objetivo en cada pozo. Después de lavar, la cantidad de anticuerpo presente en un pozo será proporcional a la cantidad de anticuerpo específico de objetivo unido a ese pozo. El anticuerpo detector se puede conjugar directamente o indirectamente a un marcador o a otro sistema indicador (tal como una enzima), de tal manera que se puede determinar la cantidad de anticuerpo detector que queda en cada pozo. Entre mayor es la potencia del polipéptido que se prueba que estuvo en el pozo, menor será el anticuerpo específico objetivo intacto que quedará y de esta manera habrá menos anticuerpo detector. Normalmente, por lo menos un pozo en una placa de ensayo dada incluirá el IdeS en lugar de un polipéptido que se va a probar, de tal manera que la potencia de los polipéptidos probados se puede comparar directamente con la potencia de IdeS. También se pueden incluir IdeZ e IdeS/Z para comparación.

Otros ensayos pueden determinar la potencia de un polipéptido probado al visualizar y/o cuantificar directamente los fragmentos de IgG que resultan de la división de IgG mediante un polipéptido probado. Un ensayo de este tipo también se describe en los ejemplos. Tal un ensayo incubará normalmente una muestra de IgG con un polipéptido de prueba (o

con uno o más de IdeS, IdeZ e IdeS/Z como un control) en concentraciones diferentes en una serie de valoración. Los productos que resultan de la incubación en cada concentración se separan luego utilizando electroforesis de gel, por ejemplo, mediante SDS-PAGE. El IgG completo y los fragmentos que resultan de la división de IgG se pueden identificar luego mediante tamaño y se pueden cuantificar mediante la intensidad de la tinción con un tinte adecuado. Entre mayor es la cantidad de fragmentos de división, mayor es la potencia de un polipéptido probado en una concentración dada. Un polipéptido de la invención producirá normalmente cantidades detectables de fragmentos de división en una menor concentración (un punto más bajo en la serie de valoración) que la IdeZ y/o IdeS. Este tipo de ensayo también puede permitir la identificación de polipéptidos de prueba que son más efectivos en dividir la primera y segunda cadenas pesadas de una molécula IgG, ya que también se pueden cuantificar los diferentes fragmentos que resultan de cada evento de división. Un polipéptido de la invención puede ser más efectivo en dividir la primera cadena de una molécula IgG que la segunda cadena (véase representación esquemática en la figura 18), particularmente cuando el IgG es un isotipo IgG2. Un polipéptido de la invención puede ser más efectivo en dividir IgG1 que IgG2.

Este tipo de ensayo también se puede adaptar para determinar el grado en el que se puede reducir la presencia de ADA específico para IdeS de un polipéptido de la invención. En el ensayo adaptado, cuando se incuba una muestra de IgG con un polipéptido de prueba (o con IdeS como un control), se incluye suero o un ADA específico para IdeS que contiene la preparación IVIg con el medio de reacción. Preferiblemente, la potencia de un polipéptido de la invención no se ve afectada por la presencia de ADA o se reduce menos por la presencia de ADA que la potencia de IdeS en el mismo ensayo. En otras palabras, preferiblemente el efecto neutralizante del ADA específico de IdeS en el polipéptido de la invención es igual que o menor que los efectos neutralizantes del ADA específico de IdeS en IdeS, medido en el mismo ensayo.

Como se indicó anteriormente, un polipéptido de la invención es normalmente menos inmunogénico que IdeS. Es decir, un polipéptido de la invención puede resultar en una respuesta igual o preferiblemente menor que el IdeS cuando se presenta en una concentración o dosis equivalente y se mide en mismo ensayo. La inmunogenicidad de un polipéptido de la invención es normalmente no mayor del 50%, no mayor del 45%, no mayor del 40%, no mayor del 35%, no mayor del 30%, o no mayor del 25% de la inmunogenicidad del IdeS medido en el mismo ensayo. Preferiblemente la inmunogenicidad de un polipéptido de la invención no es mayor del 25% de la inmunogenicidad del IdeS medido en el mismo ensayo.

Ensayos para evaluar la inmunogenicidad de un polipéptido también se conocen en la técnica y se puede utilizar cualquier ensayo adecuado. Ensayos preferidos para evaluar la inmunogenicidad de un polipéptido con relación a la inmunogenicidad de IdeS implica evaluar el grado al que el ADA específico para IdeS también se une a un polipéptido de la invención. Ensayos de este tipo se describen en los ejemplos.

Uno de dichos ensayos implica probar para competición entre IdeS y un polipéptido de prueba para unión a ADA específico para IdeS. Normalmente, los pozos de una placa de ensayo se cubren con IdeS, seguido por administración de una mezcla preincubada de una solución que contiene ADA específico de IdeS, por ejemplo, una preparación IVIg y un polipéptido de prueba (o IdeS como un control). La preincubación tiene lugar en presencia de un inhibidor de actividad de proteasa de cisteína IgG, por ejemplo, el ácido yodoacético (IHAc), y en altas concentraciones de sal de tal manera que solo se permite la alta afinidad de unión entre la proteína y ADA. La mezcla preincubada se deja interactuar con pozos IdeS recubiertos. Cualquier ADA específico para IdeS no se une al polipéptido de prueba se unirá al IdeS en los pozos. Después de un intervalo adecuado, la placa de ensayos se lavará y un anticuerpo detector que se une específicamente a IgG se agregará bajo condiciones adecuadas para unión. El anticuerpo detector se unirá a cualquier ADA que se haya unido a IdeS en cada pozo. Después de lavar, la cantidad de anticuerpo detector presente en un pozo será inversamente proporcional a la cantidad de ADA que se haya unido al polipéptido de prueba. El anticuerpo detector se puede conjugar directamente o indirectamente a un marcador o a otro sistema indicador (tal como una enzima), de tal manera que se puede determinar la cantidad de anticuerpo detector que permanece en cada pozo. Normalmente, se probará por lo menos un pozo en una placa de ensayo dada con una mezcla preincubada de IVIg e IdeS en lugar de un polipéptido que se va a probar, de tal manera que la unión de ADA a los polipéptidos probados se puede comparar directamente con la unión al IdeS, IdeZ y/o IdeS/Z que también se puede incluir para controles adicionales.

Otro ensayo adecuado implica probar el alcance al que la serie de valoración de diferentes concentraciones de ADA específico para IdeS, por ejemplo, una preparación de IVIg, se une a un polipéptido de prueba cuando se compara al IdeS y/o IdeZ como control. Preferiblemente, un polipéptido de la invención requerirá una mayor concentración de ADA para que la unión sea detectable, con relación a la concentración de ADA para la que se puede detectar el IdeS. Dicho ensayo se describe en los ejemplos. Tal ensayo implica normalmente recubrir los pozos de una placa de ensayo con el polipéptido de prueba o control, seguido por incubación con cada pozo con una concentración diferente de ADA específico para IdeS de una serie de valoración. Las incubaciones se realizan en presencia de un inhibidor de actividad de proteasa de cisteína IgG, por ejemplo, ácido yodoacético (IHAc) y una alta concentración de sal de tal manera que se permite sólo alta afinidad de unión entre la proteína y el ADA. Después de un intervalo adecuado, la placa de ensayo se lavará y el anticuerpo detector que se une específicamente a IgG $F(ab')_2$ se agregará bajo condiciones adecuadas de unión. El anticuerpo detector se unirá a cualquier ADA que se haya unido al polipéptido de prueba o IdeS en cada pozo. Después de lavar, la cantidad de anticuerpo detector presente en un pozo será directamente proporcional a la cantidad de ADA que se ha unido al polipéptido de prueba o control. El anticuerpo detector se puede conjugar directamente o indirectamente a un marcador o a otro sistema indicador (tal como una enzima), de tal manera que se puede detectar la

cantidad de anticuerpo detector que permanece en cada pozo. Por lo menos un pozo en una placa de ensayo dada se incubará con regulador que carece de ADA como blanco para establecer un nivel de umbral para la detección de unión en los pozos de prueba.

Características estructurales del polipéptido

Esta sección establece las características estructurales de un polipéptido de la invención, que aplica adicionalmente a las características funcionales destacadas en la sección anterior.

El polipéptido de la invención es normalmente por lo menos 100, 150, 200, 250, 260, 270, 280, 290, 300 o 310 aminoácidos de longitud. El polipéptido de la invención normalmente no es mayor de 400, 350, 340, 330, 320 o 315 aminoácidos de longitud. Se apreciará que cualquiera de los límites inferiores enumerados anteriormente se puede combinar con cualquiera de los límites superior enumerados anteriormente para proporcionar un rango para la longitud del polipéptido de la invención. Por ejemplo, el polipéptido puede ser de 100 a 400 aminoácidos de longitud o 250 a 350 aminoácidos en longitud. El polipéptido tiene preferiblemente 290 a 320 aminoácidos de longitud, más preferiblemente 300 a 315 aminoácidos de longitud.

La estructura primaria (secuencia de aminoácidos) de un polipéptido de la invención se basa en la estructura primaria de IdeZ o IdeS/Z, específicamente la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o 5, respectivamente. La secuencia de un polipéptido de la invención comprende una variante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o 5, que es por lo menos el 50% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o 5. La secuencia variante puede ser por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos, 85%, preferiblemente por lo menos 90%, por lo menos 95%, en por lo menos 98% o en por lo menos 99% idéntico a la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o 5. La variante puede ser idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o 5 aparte de la inclusión de una o más de las modificaciones específicas identificadas aquí. La identidad relativa con la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o 5 se puede medir sobre una región de por lo menos 50, por lo menos 100, por lo menos 200, por lo menos 300 o más aminoácidos contiguos de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4 o 5 o más preferiblemente sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 4 o 5.

La identidad de aminoácidos se puede calcular utilizando cualquier algoritmo adecuado. Por ejemplo, los algoritmos de PILEUP y BLAST se pueden utilizar para calcular la identidad o secuencias de identidad o alineación (tale como identificar secuencias correspondientes o equivalentes (normalmente en su configuración predeterminada), por ejemplo, como se describe en Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S, F et al (1990) J Mol Biol 215:403-10. El software para realizar los análisis BLAST está públicamente disponible a través del Centro Nacional para Información de Biotecnología (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Este algoritmo implica identificas primero pares de secuencia de calificación alta (HSP) al identificar palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que coinciden o satisfacen alguna clasificación T umbral de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. Este acierto de palabra vecina inicial actúa como semilla para iniciar búsquedas para encontrar los HSP que los contienen. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en la medida que se pueda aumentar la puntuación de alineación acumulativa. Las extensiones para los aciertos de palabra en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineación acumulada cae en una cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada baja a cero o por debajo de cero, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuo de puntuación negativa; o se alcanza el final de cada secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad de alineación. El programa BLAST utiliza como predeterminado una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:10915-10919) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5 y N = 4 y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. National Acad. SCI. LOS EE.UU. 90:5873-5787. Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad mediante la cual una coincidencia entre dos polinucleótidos o secuencias de aminoácidos ocurrirá por oportunidad. Por ejemplo, se considera una secuencia similar a otra secuencia si la probabilidad de suma más pequeña en comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia es menor de aproximadamente 1, preferiblemente menos de aproximadamente 0.001, más preferiblemente menor de aproximadamente 0.01 y más preferiblemente menor de aproximadamente 0.1. Alternativamente, el paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que se puede utilizar para calcular la identidad (por ejemplo, utilizada en su configuración predeterminada) (Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, 387-395).

La secuencia de un polipéptido de la invención comprende una variante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o 5 en la que, las modificaciones, tal como adiciones de aminoácidos, eliminaciones o sustituciones se hacen con relación con la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o 5. A menos que se especifique otra cosa, las modificaciones son preferiblemente substituciones de aminoácidos conservadoras. Las substituciones conservadoras reemplazan aminoácidos con otros aminoácidos de estructura química similar, propiedades químicas similares o volumen de cadena lateral similar. Los aminoácidos introducidos pueden tener polaridad hidrofilicidad, hidrofobicidad, basicidad, acidez, neutralidad o carga similar a los aminoácidos que reemplazan. Alternativamente, la sustitución conservadora puede introducir otros aminoácidos que son aromáticos o alifáticos en el lugar de un aminoácido aromático o alifático

preexistente. Los cabios de aminoácidos conservadores son bien conocidos en la técnica y se pueden seleccionar de acuerdo con las propiedades de 20 aminoácidos principales como se define en la tabla A1 adelante. Cuando los aminoácidos tienen polaridad similar, esto se puede determinar mediante referencia a la escala de hidropatía para cadenas laterales de aminoácidos en la tabla A2.

Tabla A1 - Propiedades químicas de aminoácidos

Ala (A)	alifático, hidrófobo, neutro	Met (M)	hidrófobo, neutro
Cys (C)	polar, hidrófobo, neutro	Asn (N)	polar, hidrófilo, neutro
Asp (D)	polar, hidrófilo, cargado (-)	Pro (P)	hidrófobo, neutro
Glu (E)	polar, hidrófilo, cargado (-)	Gln (Q)	polar, hidrófilo, neutro
Phe (F)	aromático, hidrófobo, neutro	Arg (R)	polar, hidrófilo, cargado (+)
Gly (G)	alifático, neutro	Ser (S)	polar, hidrófilo, neutro
His (H)	aromático, polar, hidrófilo, cargado (+)	Thr (T)	polar, hidrófilo, neutro
Ile (I)	alifático, hidrófobo, neutro	Val (V)	alifático, hidrófobo, neutro
Lys (K)	polar, hidrófilo, cargado (+)	Trp (W)	aromático, hidrófobo, neutro
Leu (L)	alifático, hidrófobo, neutro	Tyr (Y)	aromático, polar, hidrófobo

Tabla A2 - Escala de hidropatía

Cadena Lateral	Hidropatía
Ile	4.5
Val	4.2
Leu	3.8
Phe	2.8
Cys	2.5
Met	1.9
Ala	1.8
Gly	-0.4
Thr	-0.7
Ser	-0.8
Trp	-0.9
Tyr	-1.3
Pro	-1.6
His	-3.2
Glu	-3.5
Gln	-3.5
Asp	-3.5
Asn	-3.5
Lys	-3.9
Arg	-4.5

La secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la invención comprende una variante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o 5. Sin embargo, ciertos residuos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o 5 están preferiblemente retenidos dentro de dicha secuencia variante. Por ejemplo, dicha secuencia variante normalmente retiene determinados residuos que se saben se requieren para la actividad de proteasa de cisteína IgG. De esta manera, la cisteína en la posición 102 de la SEQ ID NO: 3 se deben retener (residuo 68 de la SEQ ID NO: 4 o 5) en la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la invención. Opcionalmente, la lisina (K) en la posición 92, la histidina (H) en la posición 272 y el ácido aspártico (D) en cada una de las posiciones 294 y 296 de la SEQ ID NO: 3 también se retienen. Existen los residuos 58, 238, 260 y 262 del terminal N de la SEQ ID NO: 4 y los 58, 236, 258 y 260 del terminal N de la SEQ ID NO: 5, respectivamente. Sin embargo, un polipéptido de la invención normalmente comprende de una variante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, que tiene una cisteína (C) en la posición en dicha secuencia variante que corresponde a la posición 102 de la SEQ ID NO: 3; y opcionalmente tiene en las posiciones en dicha secuencia variante corresponde a las posiciones 92, 272, 294 y 296 de la SEQ ID NO: 3, una lisina (K), una histidina (H), un ácido aspártico (D) y un ácido aspártico (D), respectivamente.

Partiendo de las limitaciones estructurales anteriores, los inventores identificaron posiciones específicas para modificación para ajustar las propiedades funcionales de IdeS al evaluar un modelo tridimensional de IdeS. Los inventores identificaron que:

(1) Reemplazar la asparragina (N) en la posición 138 de la SEQ ID NO: 3 con un aminoácido cargado positivamente mejora la potencia de un polipéptido que incorpora este cambio. De esta manera, un polipéptido de la invención puede comprender una variante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o 5 que tiene un aminoácido cargado positivamente en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 138 de la SEQ ID NO: 3. los aminoácidos cargados positivamente se identifican en la tabla A1 anterior. Los aminoácidos cargados positivamente son preferiblemente arginina (R) o lisina (K). De acuerdo con lo anterior esta modificación particular se puede identificar aquí por el término “N138R/K”.

(2) Reemplazar la asparragina (N) en la posición 139 de la SEQ ID NO: 3 con un aminoácido cargado positivamente mejora la potencia de un polipéptido que incorpora este cambio. Sin embargo, un polipéptido de la invención puede comprender una variante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o 5 que tiene un aminoácido cargado positivamente en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 139 de la SEQ ID NO: 3. Los aminoácidos cargados positivamente comunes se identifican en la tabla A anterior. Los aminoácidos cargados positivamente son preferiblemente arginina (R) o lisina (K). De acuerdo con lo anterior esta modificación particular se puede identificar aquí por el término “N139R/K”.

(3) La eliminación de los veinte primeros residuos en el terminal N de la SEQ ID NO: 3 puede mejorar la potencia de un polipéptido que incorpora este cambio y/o puede reducir la inmunogenicidad sin afectar adversamente la potencia. Estos primeros veinte residuos en el terminal N de la SEQ ID NO: 3 consisten de la secuencia contigua DDYQRNATEAYAKEVPHQIT. De esta manera, un polipéptido de la invención puede comprender una variante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o 5 que no incluye la secuencia contigua DDYQRNATEAYAKEVPHQIT. Es decir, los primeros veinte residuos en el terminal N de la SEQ ID NO: 4 o 5 pueden estar ausentes de dicha variante de la SEQ ID NO: 4 o 5. Los primeros veinte residuos de la SEQ ID NO: 4 y 5 corresponden a las posiciones 35-54 de la SEQ ID NO: 3. De acuerdo con lo anterior esta modificación particular se puede identificar aquí por el término “D35_T54del”.

(4) La región que corresponde a posiciones 63 – 73 de la SEQ ID NO: 3 es importante para la actividad de proteasa de cisteína de IgG de un polipéptido de la invención. Las modificaciones en esta región mejoran principalmente la capacidad del polipéptido para dividir la segunda cadena pesada de IgG, pero también mejoran la división de la primera cadena pesada de IgG. Específicamente, modificar uno o más residuos dentro de esta región en favor del residuo correspondiente (o un aminoácido con características similares al residuo correspondientes) en la región equivalente del IdeS aumenta la potencia de un polipéptido de la invención. La región equivalente en IdeS corresponde a posiciones de 58 - 65 de la SEQ ID NO: 1. La siguiente alineación muestra posiciones 63-73 de la SEQ ID NO: 3 junto con las posiciones 58-65 de la SEQ ID NO: 1.

63 PLTPEQFRYNN73 (región de IdeZ, SEQ ID NO: 3)

58 P - PANFT-QG65 (región de IdeS, SEQ ID NO: 1)

“-” indica ausencia de residuo

De esta manera, un polipéptido de la invención puede comprender una variante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o 5, cuya variante puede obtener por lo menos una de las siguientes modificaciones:

i. una eliminación de los residuos leucina (L) y de treonina (T) en las posiciones en dicha variante que corresponden a posiciones 64 y 65 de la SEQ ID NO: 3;

ii. una treonina (T) en lugar de la arginina (R) en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 70 de la SEQ ID NO: 3;

iii. una eliminación de la tirosina (Y) en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 71 de la SEQ ID NO: 3;

iv. una glutamina (Q) en lugar de la asparragina (N) en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 72 de la SEQ ID NO: 3;

v. una glicina (G) en lugar de la asparragina (N) en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 73 de la SEQ ID NO: 3;

vi. una alanina (A) en lugar de ácido glutámico (E) en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 67 de la SEQ ID NO: 3;

vii. una asparagina (N) en lugar de la glutamina (Q) en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 68 de la SEQ ID NO: 3.

Por lo menos una modificación de las opciones i. a vii. Anteriores se seleccionan normalmente de las opciones i. v. Un polipéptido de la invención puede comprender una variante de la secuencia de aminoácidos la ID no: 4 o 5, cuya variante tiene por lo menos dos, tres, cuatro o todas las cinco modificaciones de i. a v. preferiblemente, dicha variante tiene por lo menos uno, dos, tres de todas las cuatro modificaciones ii. a v., y opcionalmente la modificación i. también está presente. En una variante particularmente preferida, todas las modificaciones i. a v. están presentes.
En resumen, por lo tanto, un polipéptido de la invención comprende una variante de la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o 5, cuya variante:

(a) es por lo menos 50% idéntica a SEQ ID NO: 4 o 5;

(b) tiene una cisteína (C) en la posición en dicha secuencia variante que corresponde a la posición 102 de la SEQ ID NO: 3; y, opcionalmente,

(c) tiene, en las posiciones en dicha secuencia variante que corresponden a posiciones 92, 272, 294 y 296 de la SEQ ID NO: 3, una lisina (K), una histidina (H), un ácido aspártico (D) y un ácido aspártico (D), respectivamente.

Preferiblemente, dicha variante de la SEQ ID NO: 4 o 5:

(1) tiene un aminoácido cargado positivamente en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 138 de la SEQ ID NO: 3, opcionalmente en el que dicho aminoácido cargado positivamente es arginina (R) o lisina (K); y/o

(2) tiene un aminoácido cargado positivamente en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 139 de la SEQ ID NO: 3, opcionalmente en el que dicho aminoácido cargado positivamente es arginina (R) o lisina (K); y/o

(3) no incluye la secuencia contigua DDYQRNATEA YAKEVPHQIT; y/o

(4) tiene por lo menos una de las siguientes modificaciones:

i. una eliminación de los residuos leucina (L) y treonina (T) en las posiciones en dicha variante que corresponden a las posiciones 64 y 65 de la SEQ ID NO: 3;

ii. una treonina (T) en lugar de la arginina (R) en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 70 de la SEQ ID NO: 3;

iii. una eliminación de la tirosina (Y) en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 71 de la SEQ ID NO: 3;

iv. una glutamina (Q) en lugar de la asparragina (N) en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 72 de la SEQ ID NO: 3;

v. una glicina (G) en lugar de la asparragina (N) en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 73 de la SEQ ID NO: 3;

vi. una alanina (A) en lugar de ácido glutámico (E) en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 67 de la SEQ ID NO: 3;

vii. una asparagina (N) en lugar de la glutamina (Q) en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 68 de la SEQ ID NO: 3.

En el que por lo menos una modificación de (4) se selecciona típicamente de las opciones i. a v y en el que preferiblemente todas las opciones ii. a v. están presentes opcionalmente también con la opción i.

Un polipéptido de la invención comprende normalmente una variante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o 5 cuya variante incluye por lo menos uno, dos, tres o todas las cuatro modificaciones (1) a (4) establecidas anteriormente. Dicha variante puede incluir cualquier combinación de dos o tres de las modificaciones de (1) a (4). Una variante preferida incluye la modificación (3) y por lo menos una de las modificaciones (1) y (2). Alternativamente, la variante puede incluir ninguna de las modificaciones (1) a (3) establecidas anteriormente.

Los inventores han determinado también que determinadas otras modificaciones en la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o 5, que se pueden aplicar alternativamente, o adicionalmente cualquier combinación de las modificaciones descritas anteriormente, puede aumentar la potencia de un polipéptido de la invención y/o puede reducir el reconocimiento de un polipéptido de la invención por ADA específico para IdeS. De esta manera, alternativamente, las modificaciones establecidas anteriormente, el polipéptido de la invención puede comprender:

(A) una variante de la secuencia de la SEQ ID NO: 4 en la que se hace una sustitución en una o más de las posiciones que corresponden a las posiciones 84, 93, 95, 97, 137, 140, 147, 150, 162, 165, 166, 171, 174, 205, 226, 237, 239, 243, 250, 251, 254, 255, 282, 288, 312, 315, 347, 349 de la SEQ ID NO: 3, y/o en la que la secuencia contigua que corresponde a las posiciones 36 a 53 de la SEQ ID NO: 3 se reemplaza con la secuencia contigua que corresponde a las posiciones 31 y 48 de la SEQ ID NO: 2 (este cambio se puede denominar “D36_I53replacedS31_V48 de la SEQ 2”); o

(B) una variante de la secuencia de la SEQ ID NO: 5 en la que se hace una sustitución en uno o más de las posiciones que corresponden a las posiciones 77, 93, 95, 99, 140, 141, 147, 150, 162, 171, 174, 175, 176, 177, 206, 224, 237, 241, 242, 245, 246, 249,253, 267, 280, 286, 310, 311, 313, 344, 345, 346, 347.

Dicha variante (A) puede comprender una sustitución en todas las posiciones enumeradas, o cualquiera de una o más de las posiciones enumeradas, pero normalmente comprende una sustitución en no más de doce, once o diez de esas posiciones.

Dicha variante (B) puede comprender una sustitución en todas las posiciones enumeradas, o cualquier combinación de una o más de las posiciones enumeradas, pero normalmente comprende una sustitución en no más de treinta de esas posiciones.

Las sustituciones normalmente reemplazan el aminoácido existente con otro aminoácido que tiene diferentes propiedades. Por ejemplo, un aminoácido no cargado se puede reemplazar con un aminoácido cargado y viceversa. Se establecen sustituciones preferidas en esas posiciones en la tabla B1 y B2 adelante utilizando el código de una letra:

Tabla B1 – variante A

Aminoácidos existentes en la SEQ ID NO: 4	Posición en la SEQ ID NO: 3	Reemplazo preferido
H	84	N
A	93	T
D	95	N
K	97	A
F	137	I
Q	140	E
A	147	E
D	150	R
N	162	E
R	165	K
D	166	E
N	171	Y
A	174	T
N	205	K
D	226	N
L	237	F
N	239	E
N	243	K
K	250	S
Q	251	E
T	254	E
E	255	K
N	282	D

E	288	K
A	312	K
H	315	K
K	347	Q
S	349	N

Tabla B2-variante B

Aminoácidos existentes en la SEQ ID NO: 5	Posición en la SEQ ID NO: 3	Reemplazo preferido
F	77	I
A	93	T
D	95	N
N	99	D
D	140	E
N	141	Q
K	147	E
D	150	R
N	162	E
G	171	Y
A	174	T
R	175	K
R	176	H
I	177	L
E	206	K
D	224	N
N	237	E
N	241	K
D	242	E
T	245	D
I	246	L
Q	249	E
K	253	E
S	267	R
N	280	D
E	286	K
A	310	K
H	311	A
H	313	K
Q	344	N
K	345	Q
L	346	T
S	347	N

Cada una de estas sustituciones en las tablas B1 y B2 se puede denominar aquí, utilizando un término obtenido al combinar las entradas en la primera, segunda y tercera columnas para cada una de las filas de izquierda a derecha. Por ejemplo, la sustitución en la primera fila de la tabla B1 se puede denominar aquí como “H84N”, la sustitución en la segunda fila se puede denominar como “A93T” y así sucesivamente. La modificación específica “D226N” en la tabla B1 y “D224N” en la tabla B2 se pretende que interrumpan un motivo de adhesión de célula conocida en la secuencia de IdeZ y IdeS/Z, que es contigua a la secuencia RGD en las posiciones 224-226 de la SEQ ID NO: 3.

La tabla C1 y C2 adelante resumen las modificaciones hechas para producir las secuencias de aminoácidos de determinados polipéptidos de ejemplo de la invención.

Tabla C1

Referencia interna	Modificaciones racionadas con IdeZ (SEQ ID NO: 4) (posiciones que corresponden a la SEQ ID NO: 3)	SEQ ID NO de secuencia completa
pCART197	H84N, N138R, A147E,D150R, N162E, N171Y, N205K, D226N, Q251E, E255K, A312K, S349N	6

pCART198	A93T, D95N, Q140E, R165K, D166E, A174T, D226N, L237F, N239E, N243K, N282D, E288K, H315K, K347Q	7
pCART200	D36_I53reemplazadoS31_V48 de SEQ 2 es decir SFSANQEI RYSEVTPYHV reemplaza DYQRNATE AYAKEVPHQI	8
pCART201	D35_T54del	9
pCART202	R70T, Y71del, N72Q, N73G	10
pCART203	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G	11
pCART204	R70T, Y71del	12
pCART206	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, F137I	13
pCART207	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R	14
pCART208	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, F137I, N138R	15
pCART210	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, H84N, N138R, N162E, N205K, D226N	16
pCART217	D35_T54del, L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R, D226N	17
pCART219	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, K97A, N138R, D226N	18
pCART226	D35_T54del, L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, K97A, N138R, D226N	19
pCART229	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R, D226N	20

Tabla C2

Referencia interna	Modificaciones racionadas con IdeZ (SEQ ID NO: 5) (posiciones que corresponden a la SEQ ID NO: 3)	SEQ ID NO de secuencia completa
pCART191	R70T, Y71del, N72Q, N73G, D140E, G171Y, R175K, R176H, I177L, S267R	21
pCART192	R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R, D140E, K147E, D150R, N162E, G171Y, R175K, R176H, I177L, E206K, Q249S, K253N, S267R, A310K, S347N	22
pCART193	R70T, Y71del, N72Q, N73G, A93T, D95N, N99D, D140E, N141Q, K147E, N162E, G171Y, A174T, R175K, R176H, I177L, N237E, N241K, D242E, T245D, I246L, K253E, S267R, E286K, H311A, H313K, Q344N, K345Q, L346T	23
pCART194	R70T, Y71del, N72Q, N73G, A93T, D95N, N99D, N138R, D140E, N141Q, K147E, D150R, N162E, G171Y, A174T, R175K, R176H, I177L, E206K, N237E, N241K, D242E, T245D, I246L, Q249E, S267R, N280D, E286K, A310K, H311A, H313K, Q344N, K345Q, L346T, S347N	24
pCART205	L64_65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, F77I, N138R, D140E, N141Q	25

La secuencia de aminoácido de cada una de la SEQ ID NO: 1 a 5 se reproduce completamente adelante, seguida por la secuencia de aminoácidos de cada uno de los polipéptidos de ejemplo de la invención descrita en las tablas C1 y C2.

SEQ ID NO: 1

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGW
YDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFEYFKEK
AFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKK
ELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGV
NSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 2

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTFNGKDDLLCGAATA
GNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHL
GVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLI
KKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAIS
AKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 3

MKTIAYPNKPHSLSAGLLTAIAIFSLASSNITYADDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLA
HQGWYDITKAFDGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAAIDTKDSQTNSQLFNY
FRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGL
NDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGE
NIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 4

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDGKDNLLCGAATAGNMLHW
WFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYL
NVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINL
WGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 5

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVFHAPYVANQGWYDITKAFDGKDNLLCGAATAGNMLH
WWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGDNMFDVKKAIDTKNHQLDSKLFNYFKEKAFPGLSARRIGVFPDHVIDMFINGY
RLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKNKNLNDISTIIKQELTKGKALGLSHTYANVSINHVINL
WGADFNAEGNLEAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSTGQDSWQKLS

SEQ ID NO: 6 (pCART197)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLANQGWYDITKAFDGKDNLLCGAATAGNMLHW
WFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKEAIRTKDSQTNSQLFEYFRDKAFPYLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYL
NVFKTQSTDVKRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGNQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKEELTKGRALALSHTYANVSISHVINL
WGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINKHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLN

SEQ ID NO: 7 (pCART198)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKTFNGKDNLLCGAATAGNMLHW
WFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNEELFDLKAAIDTKDSQTNSQLFNYFKEKAFPNLSTRQLGVMPDLVLDMFINGYYLN
VFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGNQTTLLTARHDFKEKGLKDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLW
GADFDAEGNLKAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGKVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQQLS

SEQ ID NO: 8 (pCART200)

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDGKDNLLCGAATAGNMLHW
WFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYL
NVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINL
WGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 9 (pCART201)

SVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQ
KIIFNNQELFDLKAAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKR
GGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFNAEGNLEAIYVTDSDA
NASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 10 (pCART202)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDGKDNLLCGAATAGNMLHW
WFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYL
NVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINL
WGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 11 (pCART203)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDGKDNLLCGAATAGNMLHWWF
DQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVF
KTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGA
DFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 12 (pCART204)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDGKDNLLCGAATAGNMLHWW
FDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNV
FKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWG
ADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 13 (pCART 206)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDGKDNLLCGAATAGNMLHWWF
DQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIINNQELFDLKAAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVF
KTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGA
DFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 14 (pCART207)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDGKDNLLCGAATAGNMLHWWF
DQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKAAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVF
KTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGA
DFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 15 (pCART208)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDGKDNLLCGAATAGNMLHWWF
DQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIIRNQELFDLKAAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVF
KTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGA
DFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 16 (pCART210)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLANQGWYDITKAFDGKDNLLCGAATAGNMLHWWF
DQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKEAIRTKDSQTNSQLFEYFRDKAFPYLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVF
KTQSTDVKRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGNQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKEELTKGRALALSHTYANVSISHVINLWGA
DFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINKHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLN

SEQ ID NO: 17 (pCART217)

SVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIF
RNQELFDLKAAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGI
FDAVFTRGNQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFNAEGNLEAIYVTDSDANA
SIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 18 (pCART219)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDG**A**DNLLCGAATAGNMLHWWF
DQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFR**N**QELFDLKAAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVF
KTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRG**N**QTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGA
DFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 19 (pCART226)

SVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDGADNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIF
RNQELFDLKAAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGI
FDAVFTRGNQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFNAEGNLEAIYVTDSDANA
SIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 20 (pCART229)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDGKDNLLCGAATAGNMLHWWF
DQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKAAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVF
KTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGNQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGA
DFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 21 (pCART191)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKAFDGKDNLLCGAATAGNMLHW
WFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGENMFDVKKAIDTKNHQLDSKLFNYFKEKAFPYLSAKHLGVFPDHVIDMFINGYRL

SLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKNKNLNDISTIIKQELTKGKALGLSHTYANVRINHVINLWG
ADFNAEGNLEAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSTGQDSWQKLS

SEQ ID NO: 22 (pCART192)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKAFDGKDNLLCGAATAGNMLHW
WFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFRGENMFDVKEAIRTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSAKHLGVFPDHVIDMFINGYRL
SLTNHGPTPVKKGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKNKNLNDISTIIKSELTNGKALGLSHTYANVRINHVINLWG
ADFNAEGNLEAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNKHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSTGQDSWQKLN

SEQ ID NO: 23 (pCART193)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHW
WFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRL
SLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKQELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLW
GADFDAEGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNAAGKVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTS

SEQ ID NO: 24 (pCART194)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHW
WFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFRGEQMFDVKEAIRTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRL
SLTNHGPTPVKKGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKEELTKGKALGLSHTYANVRINHVINLWG
ADFDAEGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNKAGKVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 25 (pCART205)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYVANQGWYDITKAFDGKDNLLCGAATAGNMLHWWF
DQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFRGEQMFDVKKAIDTKNHQLDSKLFNYFKEKAFPGLSARRIGVFPDHVIDMFINGYRLSL
TNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKNKNLNDISTIIKQELTKGKALGLSHTYANVSINHVINLWGAD
FNAEGNLEAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSTGQDSWQKLS

El polipéptido de la invención puede comprender, consistir esencialmente, o consistir de la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 6 a 25. Cada una de la SEQ ID NO: 6 a 25 puede opcionalmente incluir una metionina adicional en el terminal N y/o un marcador histidina en el terminal C. La etiqueta histidina consiste preferiblemente de seis residuos de histidina. La etiqueta histidina se liga preferiblemente al terminal C por un ligador de residuos glicina 3 x o glicina 5 x.
Producción de polipéptidos

Un polipéptido como se divulga aquí se puede producir mediante cualquier medio adecuado. Por ejemplo, el polipéptido se puede sintetizar directamente utilizando técnicas estándar, conocidas en la materia, tal como química de fase sólida Fmoc, química de fase sólida Boc o mediante síntesis de péptidos de fase de solución. Alternativamente, se puede producir un polipéptido al transformar una célula, normalmente una célula bacteriana, con una molécula de ácido nucleico o vector que codifica dicho polipéptido. La producción de polipéptidos mediante la expresión en células anfitrionas bacterianas se describe adelante y se ejemplifica en los ejemplos. La invención proporciona moléculas de ácido nucleico y vectores que codifican un polipéptido de la invención. La invención también proporciona una célula anfitriona que comprende dicho vector o ácido nucleico. Moléculas de polinucleótidos de ejemplo codifican polipéptidos divulgados aquí se proporcionan como en la SEQ ID NO: 33 a 55. Cada una de estas secuencias incluye en el extremo 3' un codón de metionina de terminal N (ATG) y, antes del codón de detención (TAA) en el extremo 5', codones para un enlazador 3x gly y un marcador de histidina 6x hys, que se excluyen opcionalmente.

Los términos “molécula de ácido nucleico” y “polinucleótido” se utilizan intercambiablemente aquí y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Ejemplos no limitantes de polinucleótidos incluyen un gen, un fragmento de gen, ARN mensajero (mARN), cADN, polinucleótidos recombinantes, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Un Polinucleótido de la invención se puede proporcionar en forma aislada o substancialmente aislada. Por substancialmente aislado, quiere decir que puede haber aislamiento sustancial, pero no total, del polipéptido de cualquier medio circundante. Los polinucleótidos se pueden mezclar con portadores o diluyentes que no interferirán con su uso pretendido y será considerados aun como substancialmente aislados. Una secuencia de ácido nucleico que “codifica” un polipéptido seleccionado es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso de ADN) y se traduce (en el caso de mARN) en un polipéptido en vivo cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas, por ejemplo, en un vector de expresión. Los límites de la secuencia de codificación se determinan por un codón de inicio en el terminal 5' (amino) y un codón de detención de traducción en el terminal 3' (carboxi). Para los propósitos de la invención, dichas secuencias de ácido nucleico pueden incluir, pero no se limitan a, cADN de mARN viral, procariota o eucariota, secuencias genómicas de ADN o ARN procariota o viral y incluso secuencias de ADN sintéticas. Una secuencia de terminación de transcripción se puede ubicar en 3' hacia la secuencia de codificación.

Los polinucleótidos se pueden sintetizar de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, como se describe por vía de ejemplo en Sambrook et al (1989, Molecular Cloning - a laboratory manual; Cold Spring Harbor Press). Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se pueden proporcionar en la forma de un casete de expresión que incluye secuencias de control ligadas funcionalmente a la secuencia insertada, permitiendo de esta manera la expresión del polipéptido de la invención en vivo. Estos casetes de expresión, a su vez, se proporcionan normalmente dentro de vectores (por ejemplo, vectores víricos recombinantes o de plásmidos). Dicho casete de expresión se puede administrar directamente a un sujeto anfitrión. Alternativamente, un vector que comprende un polinucleótido de la invención se puede administrar a un sujeto anfitrión. Preferiblemente el polinucleótido se prepara y/o administra utilizando un vector genético. Un vector adecuado puede ser cualquier vector que sea capaz de llevar una cantidad suficiente de información genética, y permitir la expresión de un polipéptido de la invención.

La presente invención incluye de esta manera vectores de expresión que comprenden dichas secuencias de polinucleótidos. Dichos vectores de expresión se construyen rutinariamente en la técnica de biología molecular y pueden por ejemplo implicar el uso de ADN plásmido e iniciadores apropiados, promotores, mejoradores y otros elementos, tal como por ejemplo señales de poliadenilación que pueden ser necesarias, y que se posicionan en la orientación correcta, con el fin de permitir la expresión de un péptido de la invención. Otros vectores adecuados serían evidentes para el experto en la técnica. Por vía de ejemplo adicional a este respecto nos referimos a Sambrook et al.

La invención también incluye las células que se han modificado para expresar un polipéptido de la invención. Dichas células normalmente incluyen células procariotas, tal como células bacterianas, por ejemplo E. coli. Dichas células se pueden cultivar utilizando métodos de rutina para producir un polipéptido de la invención.

Un polipéptido se puede derivar o modificar para ayudar con su reproducción, aislamiento o purificación. Por ejemplo, cuando un polipéptido de la invención se produce mediante expresión recombinante en una célula anfitriona bacteriana, la secuencia del polipéptido puede incluir un residuo metionina (M) adicional en la terminal N para mejorar su expresión. Como otro ejemplo, el polipéptido de la invención se puede derivar o modificar mediante la adición de un ligando que es capaz de unir directamente y específicamente a unos medios de separación. Alternativamente, el polipéptido se puede derivar o modificar mediante la adición de un elemento de un par de unión y los medios de separación que comprenden un reactivo que se deriva o modifica mediante la adición de otro elemento de un par de unión. Se puede utilizar cualquier par de unión adecuado. En una realización preferida en el que el polipéptido para uso en la invención se deriva o modifica mediante la adición de un elemento de un par de unión, el polipéptido es preferiblemente histidina etiquetada o biotina etiquetada. Normalmente la secuencia que codifica el aminoácido de histidina o etiqueta biotina se incluye en el nivel de gen y el polipéptido se expresa recombinantemente en E. coli. La etiqueta biotina o histidina esta normalmente presente en cualquier extremo del polipéptido, preferiblemente en el terminal C. Se puede unir directamente al polipéptido o unir indirectamente mediante cualquier secuencia ligadora adecuada, tal como 3, 4 o 5 residuos glicina. La etiqueta histidina normalmente consiste de seis residuos histidina, aunque pueden ser mayores que esto, normalmente hasta 7, 8, 9, 10 o 20 aminoácidos o más corta, por ejemplo 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos de un polipéptido se puede modificar para incluir aminoácidos que nos e presentan en forma natural, por ejemplo, para aumentar la estabilidad. Cuando los polipéptidos se producen por medios sintéticos, dichos aminoácidos se pueden introducir durante producción. Los polipéptidos también se pueden modificar siguiendo producción sintética o recombinante. Los polipéptidos también se pueden producir utilizando aminoácidos D. En dichos casos los aminoácidos se ligarán en la secuencia inversa en la orientación C a N. Esto es convencional en la técnica de producir dichos polipéptidos.

Se conocen en la técnica una serie de modificaciones de cadena lateral que se pueden hacer a las cadenas laterales de los polipéptidos, sujeto a los polipéptidos que retienen cualquier actividad adicional o característica que pueda ser especifica allí. También se entiende que los polipéptidos se pueden modificar químicamente, por ejemplo, modificar postraduccional. Por ejemplo, se pueden glicosilar, fosforilar o comprender residuos de aminoácidos modificados.

El polipéptido puede ser PEGilado. El polipéptido de la invención puede estar en una forma sustancialmente aislada. Se puede mezclar con portadores o diluyentes (como se discute adelante) que no interferirán con el uso pretendido y se considerarán aun como substancialmente aislados. También puede estar en cualquier forma sustancialmente purificada, en cuyo caso comprenderá generalmente por lo menos 90%, por ejemplo, por lo menos 95%, 98% o 99%, de la proteína en la preparación.

Composiciones y formulaciones que comprenden polipéptidos

En otro aspecto de la presente invención proporciona composiciones que comprende un polipéptido de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona una composición que comprende uno o más polipéptidos de la invención y por lo menos un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. El portador debe ser 'aceptable' en el sentido de ser compatible con otros ingredientes de la composición y no perjudicial para un sujeto al que se administra la composición. Normalmente, los portadores y la composición final, son estériles y libres de pirógenos.

La formulación de una composición adecuada se puede llevar a cabo utilizando químicas de formulación farmacéutica estándar y metodologías todas las cuales ya están disponibles al experto en forma razonable. Por ejemplo, el agente se

puede combinar con uno o más vehículos excipientes farmacéuticamente aceptables. Las sustancias auxiliares, tal como agentes emulsificantes o humectantes, sustancias de la regulación del pH, agentes de reducción y similares, pueden estar presentes en el excipiente o vehículo. Los agentes de reducción adecuados incluyen cisteína, tioglicerol, tioreducina, glutationa y similares. Los excipientes, vehículos y sustancias auxiliares son en general agentes farmacéuticos que no inducen una respuesta inmunitaria del individuo que recibe la composición, y que se puede administrar sin toxicidad indebida. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, líquidos tal como agua, solución salina, polietilenglicol, ácido hialurónico, glicerol, tioglicerol y etanol. Las sales farmacéuticamente aceptables también se pueden incluir allí, por ejemplo, sales de ácido mineral como clorhidratos, bromohidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Una discusión a fondo de los excipientes farmacéuticamente aceptables, vehículos y sustancias auxiliares está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Dichas composiciones se pueden preparar, empacar, o vender en una forma adecuada para administración de bolo o para administración continua. Las composiciones inyectables se pueden preparar, empacar o vender en forma de dosificación unitaria, tal como en ampollas o en recipientes de múltiples dosis que contienen un conservante. Las composiciones incluyen, pero no se limitan a, suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, pastas y formulaciones de liberación sostenida implantables o biodegradables. Dichas composiciones pueden comprender adicionalmente uno o más ingredientes adicionales que incluyen, pero no se limitan a, agentes de suspensión, estabilizantes o dispersantes. En una realización de una composición para administración parenteral, se proporciona el ingrediente activo en forma seca (por ejemplo, un polvo o gránulos) para reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos) antes de administración parenteral de la composición reconstituida. Las composiciones se pueden preparar, empacar o vender en la forma de una solución o suspensión aceitosa o acuosa inyectable. Esta suspensión o solución se puede formular de acuerdo con la técnica conocida y puede comprender, en adición al ingrediente activo, ingredientes adicionales tales como agentes de dispersión, agentes humectantes, o agentes de suspensión descritos aquí. Dichas formulaciones inyectables estériles se pueden preparar utilizando un solvente diluyente parenteralmente aceptable no tóxico, tal como agua o 1,3-butano diol, por ejemplo. Otros diluyentes aceptables y disolventes incluyen, pero no se limitan a, solución de Ringer, solución de cloruro de sodio y aceites fijos tales como mono- o di-glicéridos sintéticos.

Otras composiciones administrables parenteralmente que son útiles incluyen aquellas que comprenden el ingrediente activo en forma microcristalina, en una preparación liposómica, o como un componente de sistemas de polímero biodegradables. Las composiciones de liberación sostenida o implante pueden comprender materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables tales como emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero escasamente soluble, o una sal escasamente soluble. Las composiciones pueden ser adecuadas para administración mediante cualquier ruta adecuada que incluye, por ejemplo, ruta intradérmica, subcutánea, percutánea, intramuscular, intraarterial, intraperitoneal, intraarticular, intraósea u otras rutas de administración apropiada. Las composiciones preferidas para administración mediante infusión intravenosa.

Métodos de uso de los polipéptidos

La invención proporciona el uso de polipéptidos de la invención en diversos métodos. Por ejemplo, los polipéptidos actuales pueden proporcionar herramientas útiles para Biotecnología. Los polipéptidos se pueden utilizar para separación ex vivo específica de IgG, en particular IgG humano. En dicho método, el polipéptido se puede incubar con una muestra que contiene IgG bajo condiciones que permiten que ocurra la actividad de proteasa de cisteína específica. La separación específica se puede verificar, y el producto de división aislar utilizando cualquier método adecuado, tal como aquellos descritos en los documentos WO2003051914 y WO2009033670. De esta manera el método se puede utilizar en particular para generar fragmentos de Fc y $F(ab')_2$. Los Fragmentos se pueden producir al llevar a cabo una etapa de reducción (por ejemplo, en 2 mercaptoetanolamina o cisteamina) en los fragmentos $F(ab')_2$ que resultan de la división de IgG con un polipéptido de la invención.

El método también se puede utilizar para detectar o analizar IgG en una muestra, o para retirar IgG de una muestra. Un método para la detección de IgG en una muestra implica normalmente incubar el polipéptido con una muestra bajo condiciones que permiten la unión específica de IgG y la división. La presencia de IgG se puede verificar mediante detección de los productos de división IgG específicos, que se pueden analizar posteriormente.

Los polipéptidos de acuerdo con la presente invención también se pueden utilizar en terapia o profilaxis. En aplicaciones terapéuticas, los polipéptidos o composiciones se administran a un sujeto que ya sufren de un afección o trastorno, en una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente la afección o uno o más de sus síntomas. Dicho tratamiento terapéutico puede resultar en una reducción en la severidad de los síntomas de la enfermedad, o un aumento en la frecuencia o duración de períodos libres de síntomas. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "cantidad terapéuticamente efectiva". En aplicaciones profilácticas, polipéptidos o composiciones se administran a un sujeto aún no exhibe los síntomas de un trastorno o afección, en una cantidad suficiente para prevenir o retardar el desarrollo de los síntomas. Dicha cantidad se define como una "cantidad profilácticamente efectiva". El sujeto puede haber sido identificado como estar en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección mediante cualquier medio adecuado. De esta la invención también proporciona un polipéptido de invención para uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal. También se proporciona aquí un método para la prevención o tratamiento de una enfermedad o

afección en un sujeto cuyo método comprende administrar un polipéptido de la invención al sujeto en una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva. El polipéptido se puede coadministrar con un agente inmunosupresor. El polipéptido se administra preferiblemente mediante infusión intravenosa, pero puede administrarse mediante cualquier ruta adecuada, por ejemplo, ruta intradérmica, subcutánea, percutánea, intramuscular, intraarterial, intraperitoneal, intraarticular, intraósea u otras rutas de administración apropiadas. La cantidad de dicho polipéptido que se administra puede ser entre 0.01 mg/kg peso corporal y 2 mg/kg peso corporal, entre 0.04 y 2 mg/kg peso corporal, entre 0.12 mg/kg peso corporal y 2 mg/kg peso corporal, preferiblemente entre 0.24 mg/kg y 2 mg/kg peso corporal y más preferiblemente entre 1 mg y 2 mg/kg peso corporal. El polipéptido se puede administrar en múltiples ocasiones al mismo sujeto, siempre que la cantidad de ADA en el suero del sujeto que sea capaz de unirse al polipéptido no exceda un umbral determinado por el médico. La cantidad de ADA en el suero del sujeto que es capaz de unir al polipéptido se puede determinar mediante cualquier método adecuado, tal como una prueba CAP FEIA específica de agente (ImmunoCAP) o un ensayo de valoración.

Los polipéptidos de la invención pueden ser particularmente útiles en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por anticuerpos IgG patogénicos. De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona un polipéptido de la invención para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por anticuerpos IgG patogénicos. La invención también proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por anticuerpos IgG patogénicos que comprende administrar a un individuo un polipéptido de la invención. El método puede comprender repartir la administración de dicho polipéptido. La invención también proporciona un polipéptido de la invención para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por anticuerpos IgG patogénicos, particularmente una enfermedad autoinmunitaria que esta mediada en todo o en parte por anticuerpos IgG patogénicos.

Los anticuerpos patogénicos pueden normalmente ser específicos para un antígeno que está dirigido en una enfermedad autoinmunitaria u otra afección mediada en todo o en parte por anticuerpos. La tabla D establece una lista de dichas enfermedades y los antígenos asociados. Un polipéptido de la invención se puede utilizar para tratar cualquiera de estas enfermedades o trastornos. El polipéptido es particularmente efectivo para el tratamiento o prevención de enfermedad autoinmunitaria que es mediada en todo o en parte por anticuerpos IgG patogénicos.

Tabla D

ENFERMEDAD	AUTOANTÍGENOS
Enfermedad de Addison	Esteroide 21-hidroxilasa, 17 alfa-Hidroxilasa (17OH) y enzima de división de cadena lateral (P450scc), Tiroperoxidasa, Tiroglobulina y H+/K(+)-
Glomerulonefritis anti-GBM (relacionada con Goodpasteur)	Membrana de base antiglomerular (anti-GBM): dominios de nanocolágeno (NCl) del colágeno alfa3alfa4alfa5(IV)
Vasculitis asociada con (ANCA) (granulomatosis de Wegener, síndrome Churg-Strauss poliangiitis microscópica)	Mieloperoxidasa, proteinasa 3
Encefalitis anti-NMDAR	Receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR)
Sindroma de anticuerpo antifosfolípido (APS) y APS catastrófico	Formación de complejos de fosfolípidos cargados negativamente con fosfolípidos que unen proteínas de plasma (por ejemplo, beta2GPI), cardiolipina, glucoproteína beta2 I, y (beta2GPI)
Enfermedades de piel bolo autoinmunitario (Pénfigo). Pénfigo foliáceo (PF), fogo selvagem (FS) (forma endémica), pénfigo vulgaris (PV)	Queratinocitos contra IgG. El objetivo específico es desmogleína (Dsg) 1 (Cadherinas dermosomicas)
Anemia hemolítica Autoimunitaria (AIHA)	Autoantígenos en glóbulos rojos
Hepatitis autoinmunitaria (AIH)	Actina, anticuerpo antinuclear (ANA), anticuerpo de músculo liso (SMA), anticuerpo microsómico de hígado/riñón (LKM-1), antígeno de hígado anti-soluble (SLA/LP) y anticuerpo anti-mitocondrial (AMA), CYP2D6, ácido CYP2C9-tienilico, UGT1A, CYP1A2, CYP2A6, CYP3A, CYP2E1, CYP11A1, CYP17 y CYP21
Neutropenia autoinmunitaria (AIN)	FcgRIIIb
Pénfigo bulloso (BP)	Proteínas hemidermosómicas BP230 y BP180 (colágeno tipo XVII), laminina 5, subunidad alfa 6 de alfa6beta4 integrina y p200
Enfermedad celiaca	Transglutaminasa 2 (TG2), transglutaminasa 3, actina, gangliosida, colágeno, calreticulina y zonulina, tiroides, páncreas endocrino, constituyentes antinucleares de hígado y antigástricos, antirreticulina, actina, músculo liso, calreticulina, desmina, colágenos, Hueso, vasos sanguíneos neuronales de gangliosidas anti-cerebro
Urticaria crónica	Subunidad alfa del receptor IgE de alta afinidad, IgE

Bloqueo cardíaco congénito completo (CCHB)	Ro (antígeno A de Síndrome de Sjögens (SSA)), La (antígeno B de Síndrome de Sjögens (SSB))
Diabetes tipo 1A (T1DM)	Anticuerpos de célula islote (ICA), anticuerpos para insulina (IAA), descarboxilasa de ácido glutámico (GAA o GAD), proteína fosfatasa tirosina (IA2 o ICA512), Péptido asociado a Insulinoma 2. El número de anticuerpos, a diferencia del anticuerpo individual, se considera que es el más predictivo de progresión para superar la diabetes.
Epidermolisis acquisita bullosa (EBA)	Dominio aminoterminal no colagenoso (NC-1) de 145 kDa de colágeno VII
Crioglobulinemia mezclada esencial	Antígenos de crioglobulinemia mezclada esencial
Síndrome de Goodpasture (también conocido como enfermedad de Goodpasture) y enfermedad de membrana base anti-glomerular	Colágeno alpha3(IV) (=antígeno Goodpasture)
Enfermedad de Graves (enfermedad de Basedow), incluye dermopatía de infiltración y exoftalmos infiltrativos, hipertiroidismo y Goitre	Receptor de Tirotropina (TSHR) peroxidasa Tiroides (TPO)
Síndrome de Guillain-Barré (GBS). Polineuropatía desmielinante antiinflamatoria aguda (AIDP), neuropatía axonal motriz aguda (AMAN)	Gangliosidas GM1, GM1b, GD1a y GalNAc-GD1a, glucoesfingolípidos, proteínas mielina PMP22 y P0
Hemofilia - Deficiencia FVIII adquirida	Factor VIII
Púrpura trombocitopénica idiopática (ITP)	Glucoproteína de plaquetas (GP) IIb - IIIa y/o GPIb - IX
Síndrome miasténico de Lambert-Eaton (LEMS)	Canales de calcio activados por voltaje
Enfermedad de tejido conjuntivo mezclado (MCTD)	IgG dirigido contra espliceosoma, U1-snRNP
Mieloma Múltiple	Antígenos de Mieloma Múltiple
Miastenia gravis Miastenia crisis	Receptores acetilcolina (AchR), quinasa específica de músculo (MuSK)
Miocarditis, cardiomiopatía dilatada (DCM) (cardiomiopatía congestiva)	Autoanticuerpos de reacción del corazón contra múltiples antígenos, por ejemplo Miosina cardiaca
Neuromielitis óptica (NMO)	Acuaporina 4 (AQP4)
Cirrosis biliar primaria (PBC)	Complejo de deshidrogenasa piruvato (PDC) -E2 y otros elementos de la familia deshidrogenasa oxaloácida, Glucoproteína-210, p62, sp100
Esclerosis Múltiple Progresiva Primaria (PPMS)	Glucoproteína de oligodendrocito de mielina (MOG), proteína de proteolípido mielina (PLP),Transquelotasa (TK), fosfodiesterasa de nucleótido cíclico tipo I (CNPasa I),Proteína 2 mediadora de respuesta de colapsina, tubulina beta4, neurofascina
Enfermedad cardiaca reumática (RHD), (Fiebre reumática)	Miosina cardiaca
Artritis Reumatoide (RA)	Colágeno tipo II, citrulina (proteínas (por ejemplo, fibrinógeno, vimentina, filagrina, colágeno tipo II, enolasa)), G6PI, RF (anti-Fc/IgG), Vimentina y citoqueratina
Enfermedad de suero-hipersensibilidad a complejo inmunitario (tipo III)	Diversos antígenos
Síndrome de Sjögren (SS)	Ro (antígeno A de síndrome de Sjögens (SS-A)), La (antígeno B de síndrome de Sjögens (SS-B)), coilina p80, anticuerpos antinucleares, antitiroide, anticuerpos anti-centrómeros (fenómeno de Raynaud), anidrasa II anticarbónica (Acidosis tubular renal Distal), anticuerpos anti-mitocondriales (patología hepática), crioglobulinas (evolución al linfoma no Hodgkin). Alfa y beta-fodrina, autoantígeno de célula islote, polimerasa poli (ADP) ribosa (PARP), NuMA, Golginas, NOR-90, receptor muscarínico M3
SLE que incluye lupus nefritis	Anticuerpos para constituyentes nucleares (por ejemplo, dsADN y nucleosomas), dsADN, PARP, Sm, PCDA, proteínas de Ribosoma PrARN, Clq
Síndrome persona rígida (SPS)	Descarboxilasa de ácido glutámico (GAD), anfifisina.

Esclerosis sistémica (escleroderma)	Topoisomerasa de I ADN (Scl-70), U3 snRNP, U2 snRNP, 7-2 RNP, NOR-90, proteínas asociadas a centrómeros y antígenos nucleolares, Anti-Th/To, Polimerasa I/III Anti-ARN, receptor anti-PDGF, anti-fibrilin-1, receptor muscarínico M3,
Rechazo de trasplante	Antígenos de rechazo de trasplante
Púrpura trombocitopénica trombótica (TTP)	ADAMTS13

En otra realización, se puede utilizar un péptido de la invención en un método para mejorar el beneficio a un sujeto de una terapia o un agente terapéutico. El método comprende dos etapas, que se denominan aquí como etapas (a) y (b).

Etapa (a) comprende administrar al sujeto un polipéptido de la invención. La cantidad de polipéptido administrada es preferiblemente suficiente para dividir substancialmente todas las moléculas IgG presentes en el plasma del sujeto. La etapa (b) comprende administrar posteriormente al sujeto dicha terapia o agente terapéutico. Las etapas (a) y (b) se separan mediante un intervalo de tiempo que es preferiblemente suficiente para que tenga lugar la división de substancialmente todas las moléculas IgG presentes en el plasma del sujeto. Dicho intervalo puede normalmente ser de por lo menos 30 minutos y a lo sumo 21 días.

El agente terapéutico cuyo beneficio se mejora es normalmente un anticuerpo que se administra para el tratamiento de cáncer u otra enfermedad. El agente terapéutico puede ser IVIg. En el contexto de esta realización, la invención se puede describir alternativamente que proporciona un método para el tratamiento de cáncer u otra enfermedad en un sujeto, el método comprende (a) administrar al sujeto un polipéptido de la invención; y (b) administrar posteriormente al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que es un tratamiento para dicho cáncer o dicha otra enfermedad; en el que:

- la cantidad de dicho polipéptido administrado es suficiente para dividir substancialmente todas las moléculas IgG presentes en el plasma del sujeto; y

- las etapas (a) y (b) se separan mediante un intervalo de tiempo de por lo menos 2 horas y a lo sumo 21 días.

En otras palabras, la invención también proporciona el polipéptido para uso en dicho método para tratamiento de cáncer u otras enfermedades. La invención también proporciona el uso del agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer u otra enfermedad mediante dicho método. El cáncer puede ser leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con SIDA, linfoma relacionado con SIDA, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitoma, carcinoma de célula basal, cerebral o cerebelar en la infancia, cáncer de conducto biliar, , cáncer de vejiga extrahepático, cáncer de huesos, histiocitoma fibroso maligno/osteosarcoma, glioma del tallo cerebral, cáncer de cerebro, tumor de cerebro, astrocitoma cerebelar, tumor de cerebro, glioma maligno/astrocitoma cerebral, tumor de cerebro, ependimoma, tumor de cerebro, meduloblastoma, tumor de cerebro, tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial, tumor de cerebro, ruta visual y glioma hipotalámico, el cáncer de mama, carcinoides/adenomas bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, tumor carcinoide, carcinoma gastrointestinal de primario desconocido, linfoma de sistema nervioso central, astrocitoma cerebelar, glioma maligno/astrocitoma cerebral, cáncer cervical, leucemia linfocítica crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos leucemia mielógena crónica, cáncer de colon, linfoma de células T cutáneas, tumor de células redondas pequeñas desmoplásicas, cáncer de endometrio, ependimoma , Cáncer esofágico, sarcoma de Ewing en la familia de tumores de Ewing, tumor de célula germinal extracraneal, tumor de célula germinal extragonadal en la infancia, cáncer de conductos biliares extrahepáticos, cáncer de ojo, melanoma Intraocular, cáncer de ojo, Retinoblastoma, cáncer de la vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), Tumor Carcinoide Gastrointestinal, tumor estromal Gastrointestinal (GIST), tumor de célula germinal: extracraneal, extragonadal, u ovárico, tumor trofoblástico gestacional, Glioma de tallo cerebral, Glioma, astrocitoma Cerebral en la niñez, Glioma, Carcinoide gástrico, hipotálamo y de ruta visual en la infancia, leucemia de tricoleucocitos, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de corazón, cáncer hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, glioma de ruta visual e hipotalámica, Melanoma Intraocular, Carcinoma de célula islote (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (cáncer de célula renales), cáncer de laringe, leucemias, leucemia linfoblástica aguda (también denominada leucemia linfocítica aguda), leucemia mieloide aguda (también denominada leucemia mielógena aguda) , leucemia linfocítica crónica (también denominada Leucemia linfocítica crónica), leucemia mielógena crónica (también denominada leucemia mieloide crónica), leucemia de tricoleucocitos, cáncer de la cavidad Oral y boca, Liposarcoma, cáncer de hígado (primario), cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, células pequeñas, linfomas, linfoma relacionado con el SIDA, linfoma de Burkitt, linfoma de células T cutáneas, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (una clasificación antigua de todos los linfomas excepto linfoma de Hodgkin), linfoma del sistema nervioso Central primario, Macroglobulinemia, Waldenström, histiocitoma fibroso maligno de hueso/Osteosarcoma, meduloblastoma, Melanoma, Melanoma Intraocular (ojo), Carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, mesotelioma maligno de adulto, cáncer de cuello epidermoide metastásico con cáncer de boca primario oculto, síndrome de Neoplasia endocrina múltiple, neoplasma de células de Plasma /mieloma múltiple, micosis fungoides, síndromes mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena, leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide aguda de adulto, Trastornos mieloproliferativos múltiples (cáncer de médula ósea) mieloma, agudo de la infancia, trastornos mieloproliferativos, cáncer de seno paranasal y de cavidad

nasal, carcinoma nasofaríngeo, Neuroblastoma, linfoma de no Hodgkin, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer Oral, cáncer orofaríngeo, histiocitoma de fibras malignas/Osteosarcoma de hueso, cáncer de ovario, cáncer epitelial de ovario (tumor estromal-epitelial de superficial), tumor de célula germinal de ovario, tumor potencial maligno bajo de ovario, cáncer pancreático, cáncer pancreático de células islote, cáncer de cavidad nasal y senos paranasales, cáncer paratiroide, cáncer de pene, cáncer faríngeo, Feocromocitoma, astrocitoma Pineal, germinoma Pineal, Pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, adenoma de pituitaria, neoplasia de células de plasma/mieloma múltiple, blastoma prepulmonar, linfoma de sistema nervioso central primario, cáncer de próstata, cáncer rectal, carcinoma de células renales (cáncer de riñón), cáncer de células de transición, uretra y pelvis Renal, Retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de glándula salival, Sarcoma, tumores de la familia de Ewing, Sarcoma de Kaposi, Sarcoma de tejidos blandos, Sarcoma uterino, síndrome de Sézary, cáncer de piel (no melanoma), Cáncer de piel (melanoma), carcinoma de piel, cáncer de pulmón de microcítico de células Merkel, cáncer de intestino delgado, carcinoma de tejidos blandos, carcinoma de células epidermoides, cáncer de cuello epidermoide con metástasis primaria, cáncer de estómago, tumor neuroectodérmico primitivo Supratentorial, linfoma de células T, micosis fungoide cutáneo y síndrome de Sézary, Cáncer Testicular, cáncer de garganta, timoma, carcinoma tímico y de timoma, cáncer de tiroides, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales de la uretra y la pelvis renal, Tumor trofoblástico, cáncer de células transicionales de pelvis renal y uretra, cáncer uretral, cáncer de útero, endometrio, sarcoma uterino, cáncer Vaginal, ruta Visual y glioma hipotalámico, cáncer Vulvar, macroglobulinemia de Waldenström y tumor de Wilms (cáncer de riñón).

El cáncer es preferiblemente cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de colon, cáncer renal, cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de cervical, cáncer de endometrio, cáncer de riñón (células renales), cáncer esofágico, cáncer de tiroides, cáncer de piel, linfoma, melanoma o leucemia.

El anticuerpo administrado en la etapa (b) es preferiblemente específico para un antígeno de tumor asociado con uno o más de los tipos de cáncer anteriores. Los objetivos de interés para un anticuerpo para uso del método incluyen CD2, CD3, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD32, CD33, CD40, CD52, CD54, CD56, CD64, CD70, CD74, CD79, CD80, CD86, CD105, CD138, CD174, CD205, CD227, CD326, CD340, MUC16, GPNMB, PSMA, Cripto, ED-B, TMEFF2, EphA2, EphB2, FAP, integrina av, Mesotelina, EGFR, GD2, CA1X, TAG-72, 5T4, integrina α4β7, Her2. Otros objetivos son citoquinas, tal como interleuquinas IL-I a IL - 13, factores de necrosis de tumor α y β, interferones α, β y γ, factor Beta de crecimiento de tumor (TGF-β), factores estimuladores de colonias (CSF) y factor estimulador de colonias de monocitos granulocitos(GMCSF). Véase Human Cytokines: Handbook for Basic & Clinical Research (Aggrawal et al. eds., Blackwell Scientific, Boston, MA, 1991). Otros objetivos son hormonas, enzimas y mensajeros intracelulares e intercelulares, tal como, adenil ciclasa, Guanil ciclasa, y fosfolipasa C. Otros objetivos de interés son antígenos de leucocitos, tal como CD20 y CD33. Los fármacos también pueden ser objetivos de interés. Moléculas objetivo pueden ser humanas, de mamífero o bacterianas. Otros objetivos son antígenos, tal como proteínas, glucoproteínas y carbohidratos de patógenos microbianos, tanto víricos como bacterianos, y tumores. Aún otros objetivos se describen en el documento U.S. 4,366,241.

El anticuerpo se puede unir directamente o indirectamente a un grupo funcional citotóxico o a un marcador detectable. El anticuerpo se puede administrar a través de una o más rutas de administración utilizando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. La ruta y/o el modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las rutas preferidas de administración para los anticuerpos incluyen ruta intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras rutas parenterales de administración, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La frase “administración parenteral” como se utiliza aquí significa modos de administración diferentes a administración entérica y tópica, usualmente por inyección. Alternativamente, se puede administrar un anticuerpo a través de una ruta no parenteral, tal como una ruta de administración tópica, epidérmica o de mucosa. También se prefiere la administración local, que incluye administración peritumoral, yuxtatumoral, intratumoral, intralesional, perilesional, infusión de intracavidad, administración intravesícula, e inhalación.

Una dosificación adecuada de un anticuerpo de la invención se puede determinar por el médico experto. Los niveles de dosificación actual de un anticuerpo se pueden variar con el fin de obtener una cantidad de ingrediente activo que sea efectiva para alcanzar la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, la composición y el modo de administración, sin ser tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos, que incluyen la actividad del anticuerpo particular empleado, la ruta de administración, el tiempo de administración, el índice de excreción del anticuerpo, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica previa del paciente que se trata y factores similares bien conocidos en las artes médicas.

Una dosis adecuada de un anticuerpo puede estar, por ejemplo, en el rango de aproximadamente 0.1µg/kg a 100 mg/kg de peso corporal del paciente que se va a tratar. Por ejemplo, una dosificación adecuada puede ser de aproximadamente de 1µg/kg a 10mg/kg de peso corporal por día o de aproximadamente 10µ g/kg a aproximadamente de 5 mg/kg de peso corporal por día.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, o etapa (b) del método puede comprender diversas dosis divididas administradas con el tiempo o la dosis se puede reducir proporcionalmente o aumentar según

se indique por las exigencias de la situación terapéutica, dado el intervalo requerido entre las etapas (a) y (b) que no se excede. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidades de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosis unitaria como se utiliza aquí se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido.

El anticuerpo de la etapa (b) se puede administrar en combinación con quimioterapia o terapia de radiación. El método puede comprender adicionalmente la administración de un anticuerpo anticáncer adicional u otro agente terapéutico, que se puede administrar junto con el anticuerpo de la etapa (b) en una única composición o en composiciones separadas como parte de una terapia combinada. Por ejemplo, el anticuerpo de la etapa (b) se puede administrar antes, después o concurrentemente con el otro agente.

El anticuerpo puede ser Abagovomab, Abciximab,Actoxumab, Adalimumab, Adecatumumab, Afelimomab, Afutuzumab, Alacizumab pegol, ALD518, Alemtuzumab, Alirocumab, Altumomab pentetate, Amatuximab, Anatumomab mafenatox, Anrukinzumab, Apolizumab, Arcitumomab, Aselizumab, Atinumab, Atlizumab (= tocilizumab), Atorolimumab, Bapineuzumab, Basiliximab, Bavituximab, Bectumomab, Belimumab, Benralizumab, Bertilimumab, Besilesomab, Bevacizumab, Bezlotoxumab, Biciromab, Bimagrumab, Bivatuzumab mertansine, Blinatumomab, Blosozumab, Brentuximab vedotina, Briakinumab, Brodalumab, Canakinumab, Cantuzumab mertansine, Cantuzumab ravtansina, Caplacizumab, Capromab pendetida, Carlumab, Catumaxomab, CC49, Cedelizumab, Certolizumab pegol, Cetuximab, Ch.14.18, Citatuzumab bogatox, Cixutumumab, Clazakizumab, Clenoliximab, Clivatuzumab tetraxetan, Conatumumab, Concizumab, Crenezumab, CR6261, Dacetuzumab, Daclizumab, Dalotuzumab, Daratumumab, Demcizumab, Denosumab, Detumomab, Dorlimomab aritox, Drozitumab, Duligotumab, Dupilumab, Dusigitumab, Ecromeximab, Eculizumab, Edobacomab, Edrecolomab, Efalizumab, Efungumab, Elotuzumab Elsilimomab, Enavatuzumab, Enlimomab pegol, Enokizumab, Enoticumab, Ensituximab, Epitumomab cituxetan, Epratuzumab, Erlizumab, Ertumaxomab, Etaracizumab, Etrolizumab, Evolocumab, Exbivirumab, Fanolesomab, Faralimomab Farletuzumab, Fasinumab, FBTA05, Felvizumab, Fezakinumab, Ficlatuzumab, Figitumumab, Flanvotumab, Fontolizumab, Foralumab, Foravirumab, Fresolimumab, Fulranumab, Futuximab, Galiximab,Ganitumab, Gantenerumab, Gavilimomab, Gemtuzumab ozogamicin, Gevokizumab, Girentuximab,Glembatumumab vedotin, Golimumab, Gomiliximab,GS6624, Ibalizumab, Ibritumomab tiuxetan, Icrucumab, Igovomab, Imciromab, Imgatuzumab, Inclacumab, Indatuximab ravtansine, Infliximab, Intetumumab, Inolimomab, Inotuzumab ozogamicin, Ipilimumab, Iratumumab, Itolizumab, Ixekizumab, Keliximab, Labetuzumab, Lampalizumab, Lebrikizumab, Lemalesomab, Lerdelimumab, Lexatumumab, Libivirumab, Ligelizumab, Lintuzumab, Lirilumab, Lodelcizumab, Lorvotuzumab mertansina, Lucatumumab, Lumiliximab, Mapatumumab, Maslimomab, Mavrilimumab, Matuzumab, Mepolizumab, Metelimumab, Milatuzumab, Minretumomab, Mitumomab, Mogamulizumab, Morolimumab, Motavizumab, Moxetumomab pasudotox, Muromonab-CD3, Nacolomab tafenatox, Namilumab, Naptumomab estafenatox, Narnatumab, Natalizumab, Nebacumab, Necitumumab, Nerelimomab, Nesvacumab, Nimotuzumab, Nivolumab, Nofetumomab merpentan, Obinutuzumab, Ocaratuzumab, Ocrelizumab, Odulimomab, Ofatumumab, Olaratumab, Olokizumab, Omalizumab, Onartuzumab, Oportuzumab monatox, Oregovomab, Orticumab, Otelixizumab, Oxelumab, Ozanezumab, Ozoralizumab, Pagibaximab, Palivizumab, Panitumumab, Panobacumab, Parsatuzumab, Pascolizumab, Pateclizumab, Patritumab, Pemtumomab, Perakizumab, Pertuzumab, Pexelizumab, Pidilizumab, Pinatuzumab vedotin, Pintumomab, Placulumab, Polatuzumab vedotin, Ponezumab, Priliximab, Pritoxaximab, Pritumumab, PRO 140, Quilizumab, Racotumomab, Radretumab, Rafivirumab, Ramucirumab, Ranibizumab,Raxibacumab, Regavirumab, Reslizumab, Rilotumumab, Rituximab, Robatumumab, Roledumab, Romosozumab, Rontalizumab, Rovelizumab, Ruplizumab, Samalizumab, Sarilumab, Satumomab pendetide, Secukinumab, Seribantumab, Setoxaximab, Sevirumab, Sibrotuzumab, Sifalimumab, Siltuximab, Simtuzumab, Siplizumab, Sirukumab, Solanezumab, Solitomab, Sonepcizumab, Sontuzumab, Stamulumab, Sulesomab, Suvizumab, Tabalumab, Tacatuzumab tetraxetan, Tadocizumab, Talizumab, Tanezumab, Taplitumomab paptox, Tefibazumab, Telimomab aritox, Tenatumomab, Teneliximab, Teplizumab, Teprotumumab, TGN1412, Ticilimumab (= tremelimumab), Tildrakizumab, Tigatuzumab, TNX-650, Tocilizumab (= atlizumab), Toralizumab, Tositumomab, Tralokinumab, Trastuzumab, TRBS07, Tregalizumab, Tremelimumab Tucotuzumab celmoleukina, Tuvirumab, Ublituximab, Urelumab, Urtoxazumab, Ustekinumab, Vapaliximab, Vatelizumab, Vedolizumab, Veltuzumab,Vepalimomab Vesencumab, Visilizumab, Volociximab, Vorsetuzumab mafodotina, Votumumab, Zalutumumab, Zanolimumab, Zatuximab, Ziralimumab o Zolimomab aritox.

Anticuerpos preferidos incluyen Natalizumab, Vedolizumab, Belimumab, Atacicept, Alefacept, Otelixizumab, Teplizumab, Rituximab, Ofatumumab, Ocrelizumab, Epratuzumab, Alemtuzumab, Abatacept, Eculizamab, Omalizumab, Canakinumab, Meplizumab, Reslizumab, Tocilizumab, Ustekinumab, Briakinumab, Etanercept, Inlfliximab, Adalimumab, Certolizumab pegol, Golimumab, Trastuzumab, Gemtuzumab, Ozogamicin, Ibritumomab, Tiuxetan, Tostitumomab, Cetuximab, Bevacizumab, Panitumumab, Denosumab, Ipilimumab, Brentuximab y Vedotina.

La terapia cuyo beneficio se mejora es normalmente un trasplante de órganos. El órgano se puede seleccionar de riñón, hígado, corazón, páncreas, pulmón o intestino delgado. El sujeto que se va a tratar puede preferiblemente ser sensibilizado o altamente sensibilizado. Por “sensibilizado” se da a entender que el sujeto ha desarrollado anticuerpos para antígenos de histocompatibilidad humana principal (DMHC) (también denominados como antígenos leucocitos humanos (HLA)). Los anticuerpos anti-HLA se originan de células B sensibilizadas alogénicamente y están usualmente

presentes en pacientes que han sido previamente sensibilizados mediante transfusión sanguínea, previo trasplante o embarazo (Jordan et al., 2003).

Sea o no que un receptor de trasplante potencial se sensibilice, se puede determinar mediante cualquier método. Por ejemplo, se puede utilizar una prueba de anticuerpos reactivos en panel (PRA) para determinar si se sensibiliza un receptor. Una puntuación PRA > 30% normalmente significa que el paciente está en “alto riesgo inmunológico” o “sensibilizado”. Alternativamente, se puede realizar una prueba de coincidencia cruzada, en la que una muestra de sangre del donante de trasplante potencial se mezcla con aquella del receptor pretendido. Una coincidencia cruzada positiva significa que el receptor tiene anticuerpos que reaccionan a la muestra del donante, lo que indica que el receptor esta sensibilizado y no puede ocurrir trasplante. Las pruebas de coinciden cruzadas se realizan normalmente como una comprobación final inmediatamente antes de trasplante.

La presencia de anticuerpos de alta valoración contra antígenos MHC del donante potencial (es decir, anticuerpos específicos de donante (DSA)) es una contraindicación directa al trasplante debido al riesgo de rechazo agudo mediado por anticuerpo. En resumen, la sensibilización a los antígenos MHC de donante impide la identificación de un donante adecuado. Una prueba de coincidencia cruzada positiva es una barrera no ambigua al trasplante. En razón a que aproximadamente una tercera de los pacientes que esperan por trasplante de riñón son sensibilizados, con un 15% como altamente sensibilizado, esto conduce a una acumulación de pacientes que esperan trasplante. En los Estados Unidos, el tiempo promedio en la lista de espera para trasplante renal en 2001-2002 fue de 1329 días para aquellos con puntuación de puntuación de 0-9% de panel reactivo a anticuerpos (PRA), 1920 para aquellos con PARA de 10 – 79% y 3649 días para aquellos con PRA del 80% o más (base de datos OPTN, 2011).

Una estrategia aceptada para superar la barrera DSA es aplicar intercambio de plasma o aplicar adsorción inmunitaria, frecuentemente en combinación con gammaglobulina intravenosa (IVIg) o Rituximab, para reducir los niveles de DSA a un nivel en donde se pueden considerar los trasplantes (Jordan et al., 2004; Montgomery et al., 2000; Vo et al., 2008a; Vo et al., 2008b). Sin embargo, el intercambio de plasma, adsorción inmunitaria y tratamientos IgIV tienen la desventaja de ser ineficientes y requerir rigurosa planeación en razón a que implican tratamientos repetidos durante un período de tiempo extendido. Cuando un órgano de un donante muerto se hace viable se tiene que trasplantar dentro de horas debido a que el tiempo de isquemia fría prolongada es uno de los factores de riesgo más importantes para la función de injerto retardada y perdida de aloinjerto en trasplante renal (Ojo et al., 1997).

En contraste, el método de la presente invención permite el retiro rápido, temporal y seguro del DSA en un receptor de trasplante potencial. Administrar el polipéptido de la invención justo antes de un trasplante tiene la capacidad de desensibilizar efectivamente un paciente altamente sensibilizado, permitiendo por lo tanto el trasplante y evitando el rechazo agudo mediado por anticuerpos. Una única dosis de polipéptido antes del trasplante permitirá al trasplante de miles de pacientes con donante con anticuerpos IgG específicos.

En el contexto de esta realización, el método se puede describir alternativamente como un método para el tratamiento de falla de órganos en un sujeto, el método comprende (a) administrar al sujeto un polipéptido de la invención y (b) posteriormente trasplantar un órgano de reemplazo en el sujeto; en el que:

- la cantidad de dicho polipéptido administrado es suficiente para dividir substancialmente todas las moléculas IgG presentes en el plasma del sujeto; y

- las etapas (a) y (b) se separan en un intervalo de tiempo de por lo menos 2 horas y a lo sumo 21 días.

En otras palabras, esta realización se puede describir como un método para evitar el rechazo de un órgano trasplantado en un sujeto, particularmente rechazo de trasplante agudo mediada por anticuerpos, el método comprende, por lo menos 2 horas y por lo menos 21 días antes de trasplante del órgano, administrar al sujeto un polipéptido de la invención, en el que la cantidad de dicho polipéptido administrado es suficiente para dividir substancialmente todas las moléculas IgG presentes en el plasma del sujeto. La invención también proporciona el uso del polipéptido de la invención en dicho método para tratar una falla de órganos o evitar el rechazo del trasplante, particularmente rechazo agudo por trasplante mediado por anticuerpo. La invención también proporciona el uso del polipéptido de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de falla órgano o para la prevención del rechazo del trasplante mediante dicho método. En esta realización, el método de la invención puede comprender adicionalmente una etapa realizada en o inmediatamente antes de trasplante, cuya etapa comprende inducción de supresión de células T y/o células B en el paciente. Dicha supresión de inducción puede normalmente comprender administrar una cantidad efectiva de un agente que mata o inhibe las células T, y/o administrar una cantidad efectiva de un agente que mata o inhibe células B. Los agentes que matan o inhiben células de Tincluyen Muromonab, Basiliximab, Daclizumab, un anticuerpo de globulina antitimoocito (ATG) y una preparación de inmunoglobulina linfocito, globulina antitimocito (ATGAM). También se sabe que el Rituximab mata o inhibe las células B.

EJEMPLOS

A menos que se indique de otra forma, los métodos utilizados son técnicas de biología molecular y bioquímica estándar. Ejemplos de libros de metodología adecuada incluyen Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989) and Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley and Sons, Inc.

Ejemplo 1 - diseño de polipéptidos, producción y purificación

La molécula IdeS madura se analiza y se identifican las regiones adecuadas para mutación. En algunos casos se utiliza evaluación en silico para evaluar la probabilidad de resultados de una mutación. Habiendo decidido sobre la secuencia de cada polipéptido, se genera el cADN que codifica cada polipéptido en el GeneCust, Luxemburgo, por mutación dirigida al sitio de una secuencia de partida o síntesis dependiendo del número de mutaciones introducidas. El cADN se secuencia y transfiere al vector de expresión pET9a (Novagene) en marco con un terminal C 6x His-tag, unido al terminal C mediante un ligador de glicina corto (3 x Gly). Se agrega metionina de terminal N para mejorar la expresión bacteriana. Los plásmidos se transforman (choque térmico) en e. coli BL21(DE3) (Stratagene) y se siembre en placas de agarosa LB que contienen 30 de µg/ml de kanamicina. Se recogen colonias individuales y se inician cultivos durante la noche (3 ml de medio LB) a 37ºC, 250 rpm. Al siguiente día se preparan as soluciones madre de glicerol y se completan con 10 ml de medio TB con 30 µg/ml de kanamicina y se inocula antiespumante con el cultivo durante la noche y se cultiva hasta OD 0.6-0.8 (37 ºC, 300 rpm). En este punto se agrega IPTG (1 mM) y se continúan los cultivos durante 1 hora antes de cosecha de la bacteria mediante centrifugación. Los glóbulos se lavan en PBS y se congelan a a-20 ºC. Se utiliza un protocolo de congelamiento-descongelamiento para lisis bacteriana (tres ciclos de congelamiento/descongelamiento en 1 ml de PBS cada uno) y las proteínas se purifican utilizando columnas preempacadas de Ni-NTA (Pierce). Después de purificación se activan las proteínas eluídas con 10 mM de DTT antes de intercambio de regulador (3 volúmenes de PBS en MWCO 9 K Millipore cfg). La pureza y estabilidad de cada proteína se evalúa utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida de sulfato dodecilo de sodio (SDS-PAGE) inoxidable, gel premoldeado Mini-PROTEAN® TGX™ al 12% (Biorad) SDS-PAGE.

La siguiente tabla resume los cambios hechos para cada polipéptido probado con relación a IdeZ o IdeS/Z, que no incluye la metionina de terminal N y el marcador his. De esta manera, la secuencia de cada polipéptido utilizado en los experimentos descritos aquí comprende normalmente la secuencia de la SEQ ID NO. como se indica en la tabla, más una metionina de terminal N adicional y un marcador His unida al extremo del terminal C mediante un ligador de glicina corto.

Referencia interna	Modificaciones relacionadas con IdeZ (SEQ ID NO: 4) (posiciones que corresponden a SEQ ID NO: 3)	SEQ ID NO
pCART197	H84N, N138R, A147E,D150R, N162E, N171Y, N205K, D226N, Q251E, E255K, A312K, S349N	6
pCART198	A93T, D95N, Q140E, R165K, D166E, A174T, D226N, L237F, N239E, N243K, N282D, E288K, H315K, K347Q	7
pCART200	D36_I53reemplazadoS31_V48 deSEQ 2 Es decir SFSANQEI RYSEVTPYHV reemplaza DYQRNATE AYAKEVPHQI	8
pCART201	D35_T54del	9
pCART202	R70T, Y71del, N72Q, N73G	10
pCART203	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G	11
pCART204	R70T, Y71del	12
pCART206	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, F137I	13
pCART207	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R	14
pCART208	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, F137I, N138R	15
pCART210	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, H84N, N138R, N162E, N205K, D226N	16
pCART217	D35_T54del, L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R, D226N	17
pCART219	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, K97A, N138R, D226N	18
pCART226	D35_T54del, L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, K97A, N138R, D226N	19
pCART229	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R, D226N	20

Referencia interna	Modificaciones relacionadas con IdeS/Z (SEQ ID NO: 5) (posiciones que corresponden a SEQ ID NO: 3)	SEQ ID NO
pCART191	R70T, Y71del, N72Q, N73G, D140E, G171Y, R175K, R176H, I177L, S267R	21
pCART192	R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R, D140E, K147E, D150R, N162E, G171Y, R175K, R176H, I177L, E206K, Q249S, K253N, S267R, A310K, S347N	22
pCART193	R70T, Y71del, N72Q, N73G, A93T, D95N, N99D, D140E, N141Q, K147E, N162E, G171Y, A174T, R175K, R176H, I177L, N237E, N241K, D242E, T245D, I246L, K253E, S267R, E286K, H311A, H313K, Q344N, K345Q, L346T	23
pCART194	R70T, Y71del, N72Q, N73G, A93T, D95N, N99D, N138R, D140E, N141Q, K147E, D150R, N162E, G171Y, A174T, R175K, R176H, I177L, E206K, N237E, N241K, D242E, T245D, I246L, Q249E, S267R, N280D, E286K, A310K, H311A, H313K, Q344N, K345Q, L346T, S347N	24
pCART205	L64_65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, F77I, N138R, D140E, N141Q	25

Como controles, se producen versiones de IdeS, IdeZ e IdeS/Z utilizando la misma metodología que se describió anteriormente. Estas versiones se denominan aquí como pCART124, pCART144 y pCART145 respectivamente.

pCART124 comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 más una metionina en el terminal N adicional y un marcador His unida al extremo del terminal C mediante un ligador de glicina corto.

Adelante se proporciona la secuencia de pCART124:

MDSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWW
FDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLS
LTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGA
DFDSNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTNGGGHHHHHH
(SEQ ID NO: 26)

pCART144 comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 4 más una metionina de terminal N adicional y un marcador His unida al extremo del terminal C mediante un ligador de glicina corto.

Adelante se proporciona la secuencia de pCART144:

MDDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDGKDNLLCGAATAGNMLH
WWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYY
LNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINL
WGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLSGGGHHHH
HH (SEQ ID NO: 27)

pCART145 comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 5 más una metionina de terminal N adicional y un marcador His unida al extremo del terminal C mediante un ligador de glicina corto.
Adelante se proporciona la secuencia de pCART145:

MDDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVFHAPYVANQGWYDITKAFDGKDNLLCGAATAGNML
HWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGDNMFDVKKAIDTKNHQLDSKLFNYFKEKAFPGLSARRIGVFPDHVIDMFING
YRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKNKNLNDISTIIKQELTKGKALGLSHTYANVSINHVIN
LWGADFNAEGNLEAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSTGQDSWQKLSGGGHH
HHHH (SEQ ID NO: 28)

El tag que carece de IdeS también se produce independientemente para el GMP estándar utilizando purificación cromatográfica multietapas automatizada, para uso como un control adicional. Este polipéptido se denomina aquí como BX1001865.

La secuencia de cADN utilizada para producir cada uno de los polipéptidos ensayados y pCART124, pCART144 y pCART145 se proporciona adelante. Cada secuencia de cADN incluye en el extremo 3' un codón para la metionina de terminal N (ATG) y, antes del codón de parada (TAA) en los codones de extremo 5', para el ligador glicina y el marcador histidina.

pCART124 (IdeS; SEQ ID NO: 33)

ATGGATAGTTTTTCTGCTAATCAAGAGATTAGATATTCGGAAGTAACACCTTATCACGTTACTTCCGTTTGGACCAAA
GGAGTTACTCCTCCAGCAAACTTCACTCAAGGTGAAGATGTTTTTCACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTAT
GATATTACCAAAACATTCAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTGGTG
GTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAGCAAAAAATAAACTTCAATGGCGA
ACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTAAAAACCACCAGCTAGATAGTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAA

AAAGCTTTCCCTTATCTATCTACTAAACACCTAGGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTCATTAACGGCTACC
GCCTTAGTCTAACTAACCACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGTAGTAAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCC
GTATTTACAAGAGGTGATCAAAGTAAGCTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAAATCTCAAAGAAATCAGT
GATCTCATTAAGAAAGAGTTAACCGAAGGCAAGGCTCTAGGCCTATCACACACCTACGCTAACGTACGCATCAACCA
TGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACCTTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGATAGTAA
TGCATCTATTGGTATGAAGAAATACTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGTAGCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAA
GAAGATAATATAGGTGCTCAAGTACTAGGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGATAGTTGGAATCAGACCAATGG
CGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART144 (IdeZ; SEQ ID NO: 34)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAGATCACTTCTGTATGGACCAA
AGGTGTTACACCACTAACACCCGAGCAGTTTCGATATAATAACGAAGATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATC
AAGGCTGGTACGATATCACCAAGGCCTTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATAT
GCTGCATTGGTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAAAGCAAAAAATCAT
TTTTAACAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATACCAAGGACAGTCAAACCAATAGTCAGCTTTTTAAT
TATTTTAGAGATAAAGCCTTTCCAAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTCTAGATATGTTTA
TCAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATCAGGACAAGGACAAACGAG
GTGGTATTTTCGATGCTGTTTTCACCAGAGGAGATCAGACAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAG
GACTAAATGACATCAGCACCATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGCC
AATGTTAGCATTAGCCATGTGATTAACTTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAGGAAACCTTGAGGCCATCTATGTC
ACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAAAAAATATTTTGTCGGCATTAATGCTCATGGACATGTCGCCATT
TCTGCCAAGAAAATAGAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATTAGGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAAGGACAT
TTGGCAGAAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART145 (IdeS/Z; SEQ ID NO: 35)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCAGATTACCAGCGTGTGGACCA
AAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTCGCTATAACAACGAAGATGTGTTTCATGCGCCGTATGTGGCGAA
CCAGGGCTGGTATGATATTACCAAAGCGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAA
CATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAGATCAGATTAAACGCTATCTGGAAGAACATCCGGAAAAACAGAAAA
TTAACTTTAACGGCGATAACATGTTTGATGTGAAAAAAGCGATTGATACCAAAAACCATCAGCTGGATAGCAAACTGT
TTAACTATTTTAAAGAAAAAGCGTTTCCGGGCCTGAGCGCGCGCCGCATTGGCGTGTTTCCGGATCATGTGATTGAT
ATGTTTATTAACGGCTATCGCCTGAGCCTGACCAACCATGGCCCGACCCCGGTGAAAGAAGGCAGCAAAGATCCGC
GCGGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTACCCGCGGCAACCAGAGCAAACTGCTGACCAGCCGCCATGATTTTAAAAA
CAAAAACCTGAACGATATTAGCACCATTATTAAACAGGAACTGACCAAAGGCAAAGCGCTGGGCCTGAGCCATACCT
ATGCGAACGTGAGCATTAACCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTTTAACGCGGAAGGCAACCTGGAAGCGAT
TTATGTGACCGATAGCGATAGCAACGCGAGCATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCGTGAACGCGCATGGCCAT
GTGGCGATTAGCGCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACCCTGAGCACC
GGCCAGGATAGCTGGCAGAAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART197 (SEQ ID NO: 36)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCAGATTACCAGCGTGTGGACCA
AAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTCGCTATAACAACGAAGATGTGATTCATGCGCCGTATCTGGCGAA
CCAGGGCTGGTATGATATTACCAAAGCGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAA
CATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAACCGAAATTGAAGCGTATCTGAGCAAACATCCGGAAAAACAGAAAA
TTATTTTTCGCAACCAGGAACTGTTTGATCTGAAAGAAGCGATTCGCACCAAAGATAGCCAGACCAACAGCCAGCTG
TTTGAATATTTTCGCGATAAAGCGTTTCCGTATCTGAGCGCGCGCCAGCTGGGCGTGATGCCGGATCTGGTGCTGG
ATATGTTTATTAACGGCTATTATCTGAACGTGTTTAAAACCCAGAGCACCGATGTGAAACGCCCGTATCAGGATAAAG
ATAAACGCGGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTACCCGCGGCAACCAGACCACCCTGCTGACCGCGCGCCATGATCT
GAAAAACAAAGGCCTGAACGATATTAGCACCATTATTAAAGAAGAACTGACCAAAGGCCGCGCGCTGGCGCTGAGC
CATACCTATGCGAACGTGAGCATTAGCCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTTTAACGCGGAAGGCAACCTGG
AAGCGATTTATGTGACCGATAGCGATGCGAACGCGAGCATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCATTAACAAACAT
GGCCATGTGGCGATTAGCGCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACCCTGA
GCAGCGGCAAAGATATTTGGCAGAAACTGAACGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART198 (SEQ ID NO: 37)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCAGATTACCAGCGTGTGGACCA
AAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTCGCTATAACAACGAAGATGTGATTCATGCGCCGTATCTGGCGCA
TCAGGGCTGGTATGATATTACCAAAACCTTTAACGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAAC
ATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAACCGAAATTGAAGCGTATCTGAGCAAACATCCGGAAAAACAGAAAAT
TATTTTTAACAACGAAGAACTGTTTGATCTGAAAGCGGCGATTGATACCAAAGATAGCCAGACCAACAGCCAGCTGT
TTAACTATTTTAAAGAAAAAGCGTTTCCGAACCTGAGCACCCGCCAGCTGGGCGTGATGCCGGATCTGGTGCTGGA
TATGTTTATTAACGGCTATTATCTGAACGTGTTTAAAACCCAGAGCACCGATGTGAACCGCCCGTATCAGGATAAAGA

TAAACGCGGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTACCCGCGGCAACCAGACCACCCTGCTGACCGCGCGCCATGATTTT
AAAGAAAAAGGCCTGAAAGATATTAGCACCATTATTAAACAGGAACTGACCGAAGGCCGCGCGCTGGCGCTGAGCC
ATACCTATGCGAACGTGAGCATTAGCCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTTTGATGCGGAAGGCAACCTGAA
AGCGATTTATGTGACCGATAGCGATGCGAACGCGAGCATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCATTAACGCGCATG
GCAAAGTGGCGATTAGCGCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACCCTGAG
CAGCGGCAAAGATATTTGGCAGCAGCTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART200 (SEQ ID NO: 38)

ATGGATAGCTTTAGCGCGAACCAGGAAATTCGCTATAGCGAAGTGACCCCGTATCATGTGACCAGCGTGTGGACCA
AAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTCGCTATAACAACGAAGATGTGATTCATGCGCCGTATCTGGCGCA
TCAGGGCTGGTATGATATTACCAAAGCGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAA
CATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAACCGAAATTGAAGCGTATCTGAGCAAACATCCGGAAAAACAGAAAA
TTATTTTTAACAACCAGGAACTGTTTGATCTGAAAGCGGCGATTGATACCAAAGATAGCCAGACCAACAGCCAGCTG
TTTAACTATTTTCGCGATAAAGCGTTTCCGAACCTGAGCGCGCGCCAGCTGGGCGTGATGCCGGATCTGGTGCTGG
ATATGTTTATTAACGGCTATTATCTGAACGTGTTTAAAACCCAGAGCACCGATGTGAACCGCCCGTATCAGGATAAAG
ATAAACGCGGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTACCCGCGGCGATCAGACCACCCTGCTGACCGCGCGCCATGATCT
GAAAAACAAAGGCCTGAACGATATTAGCACCATTATTAAACAGGAACTGACCGAAGGCCGCGCGCTGGCGCTGAGC
CATACCTATGCGAACGTGAGCATTAGCCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTTTAACGCGGAAGGCAACCTGG
AAGCGATTTATGTGACCGATAGCGATGCGAACGCGAGCATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCATTAACGCGCAT
GGCCATGTGGCGATTAGCGCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACCCTGA
GCAGCGGCAAAGATATTTGGCAGAAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART201 (SEQ ID NO: 39)

ATGAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTCGCTATAACAACGAAGATGTGATTCATG
CGCCGTATCTGGCGCATCAGGGCTGGTATGATATTACCAAAGCGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGC
GGCGACCGCGGGCAACATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAACCGAAATTGAAGCGTATCTGAGCAAACAT
CCGGAAAAACAGAAAATTATTTTTAACAACCAGGAACTGTTTGATCTGAAAGCGGCGATTGATACCAAAGATAGCCA
GACCAACAGCCAGCTGTTTAACTATTTTCGCGATAAAGCGTTTCCGAACCTGAGCGCGCGCCAGCTGGGCGTGATG
CCGGATCTGGTGCTGGATATGTTTATTAACGGCTATTATCTGAACGTGTTTAAAACCCAGAGCACCGATGTGAACCG
CCCGTATCAGGATAAAGATAAACGCGGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTACCCGCGGCGATCAGACCACCCTGCTG
ACCGCGCGCCATGATCTGAAAAACAAAGGCCTGAACGATATTAGCACCATTATTAAACAGGAACTGACCGAAGGCC
GCGCGCTGGCGCTGAGCCATACCTATGCGAACGTGAGCATTAGCCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTTTAA
CGCGGAAGGCAACCTGGAAGCGATTTATGTGACCGATAGCGATGCGAACGCGAGCATTGGCATGAAAAAATATTTT
GTGGGCATTAACGCGCATGGCCATGTGGCGATTAGCGCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTG
CTGGGCCTGTTTACCCTGAGCAGCGGCAAAGATATTTGGCAGAAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACC
ACTAA

pCART202 (SEQ ID NO: 40)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAGATCACTTCTGTATGGACCAA
AGGTGTTACACCACTAACACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAAGATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAG
GCTGGTACGATATCACCAAGGCCTTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCT
GCATTGGTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAAAGCAAAAAATCATTTTT
AACAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATACCAAGGACAGTCAAACCAATAGTCAGCTTTTTAATTAT
TTTAGAGATAAAGCCTTTCCAAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTCTAGATATGTTTATC
AATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATCAGGACAAGGACAAACGAGGT
GGTATTTTCGATGCTGTTTTCACCAGAGGAGATCAGACAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGA
CTAAATGACATCAGCACCATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGCCAA
TGTTAGCATTAGCCATGTGATTAACTTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAGGAAACCTTGAGGCCATCTATGTCA
CAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAAAAAATATTTTGTCGGCATTAATGCTCATGGACATGTCGCCATTT
CTGCCAAGAAAATAGAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATTAGGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAAGGACATT
TGGCAGAAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART203 (SEQ ID NO: 41)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAGATCACTTCTGTATGGACCAA
AGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAAGATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGT
ACGATATCACCAAGGCCTTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCATTG
GTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAAAGCAAAAAATCATTTTTAACAAC
CAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATACCAAGGACAGTCAAACCAATAGTCAGCTTTTTAATTATTTTAGA
GATAAAGCCTTTCCAAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTCTAGATATGTTTATCAATGGT
TACTACTTAAATGTGTTTAAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATCAGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATT
TTCGATGCTGTTTTCACCAGAGGAGATCAGACAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAAT
GACATCAGCACCATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGCCAATGTTAG

CATTAGCCATGTGATTAACTTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAGGAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACT
CAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAAAAAATATTTTGTCGGCATTAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCA
AGAAAATAGAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATTAGGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAAGGACATTTGGCAG
AAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART204 (SEQ ID NO: 42)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAGATCACTTCTGTATGGACCAA
AGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTCGATATAATAACGAAGATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCT
GGTACGATATCACCAAGGCCTTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCA
TTGGTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAAAGCAAAAAATCATTTTTAAC
AACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATACCAAGGACAGTCAAACCAATAGTCAGCTTTTTAATTATTTTA
GAGATAAAGCCTTTCCAAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTCTAGATATGTTTATCAATG
GTTACTACTTAAATGTGTTTAAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATCAGGACAAGGACAAACGAGGTGGTA
TTTTCGATGCTGTTTTCACCAGAGGAGATCAGACAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAA
ATGACATCAGCACCATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGCCAATGTT
AGCATTAGCCATGTGATTAACTTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAGGAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGA
CTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAAAAAATATTTTGTCGGCATTAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGC
CAAGAAAATAGAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATTAGGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAAGGACATTTGGC
AGAAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART206 (SEQ ID NO: 43)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAGATCACTTCTGTATGGACCAA
AGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAAGATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGT
ACGATATCACCAAGGCCTTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCATTG
GTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAAAGCAAAAAATCATTATTAACAAC
CAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATACCAAGGACAGTCAAACCAATAGTCAGCTTTTTAATTATTTTAGA
GATAAAGCCTTTCCAAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTCTAGATATGTTTATCAATGGT
TACTACTTAAATGTGTTTAAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATCAGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATT
TTCGATGCTGTTTTCACCAGAGGAGATCAGACAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAAT
GACATCAGCACCATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGCCAATGTTAG
CATTAGCCATGTGATTAACTTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAGGAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACT
CAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAAAAAATATTTTGTCGGCATTAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCA
AGAAAATAGAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATTAGGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAAGGACATTTGGCAG
AAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART207 (SEQ ID NO: 44)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAGATCACTTCTGTATGGACCAA
AGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAAGATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGT
ACGATATCACCAAGGCCTTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCATTG
GTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAAAGCAAAAAATCATTTTTCGTAAC
CAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATACCAAGGACAGTCAAACCAATAGTCAGCTTTTTAATTATTTTAGA
GATAAAGCCTTTCCAAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTCTAGATATGTTTATCAATGGT
TACTACTTAAATGTGTTTAAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATCAGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATT
TTCGATGCTGTTTTCACCAGAGGAGATCAGACAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAAT
GACATCAGCACCATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGCCAATGTTAG
CATTAGCCATGTGATTAACTTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAGGAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACT
CAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAAAAAATATTTTGTCGGCATTAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCA
AGAAAATAGAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATTAGGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAAGGACATTTGGCAG
AAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART208 (SEQ ID NO: 45)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAGATCACTTCTGTATGGACCAA
AGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAAGATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGT
ACGATATCACCAAGGCCTTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCATTG
GTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAAAGCAAAAAATCATTATTCGTAA
CCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATACCAAGGACAGTCAAACCAATAGTCAGCTTTTTAATTATTTTAGA
GATAAAGCCTTTCCAAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTCTAGATATGTTTATCAATGGT
TACTACTTAAATGTGTTTAAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATCAGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATT
TTCGATGCTGTTTTCACCAGAGGAGATCAGACAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAAT
GACATCAGCACCATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGCCAATGTTAG
CATTAGCCATGTGATTAACTTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAGGAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACT
CAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAAAAAATATTTTGTCGGCATTAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCA

AGAAAATAGAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATTAGGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAAGGACATTTGGCAG
AAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART210 (SEQ ID NO: 46)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCAGATTACCAGCGTGTGGACCA
AAGGCGTGACCCCGCCGGAACAGTTTACTCAAGGTGAAGATGTGATTCATGCGCCGTATCTGGCGAACCAGGGCT
GGTATGATATTACCAAAGCGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAACATGCTGCA
TTGGTGGTTTGATCAGAACAAAACCGAAATTGAAGCGTATCTGAGCAAACATCCGGAAAAACAGAAAATTATTTTTCG
CAACCAGGAACTGTTTGATCTGAAAGAAGCGATTCGCACCAAAGATAGCCAGACCAACAGCCAGCTGTTTGAATATT
TTCGCGATAAAGCGTTTCCGTATCTGAGCGCGCGCCAGCTGGGCGTGATGCCGGATCTGGTGCTGGATATGTTTAT
TAACGGCTATTATCTGAACGTGTTTAAAACCCAGAGCACCGATGTGAAACGCCCGTATCAGGATAAAGATAAACGCG
GCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTACCCGCGGCAACCAGACCACCCTGCTGACCGCGCGCCATGATCTGAAAAACAA
AGGCCTGAACGATATTAGCACCATTATTAAAGAAGAACTGACCAAAGGCCGCGCGCTGGCGCTGAGCCATACCTAT
GCGAACGTGAGCATTAGCCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTTTAACGCGGAAGGCAACCTGGAAGCGATTT
ATGTGACCGATAGCGATGCGAACGCGAGCATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCATTAACAAACATGGCCATGTG
GCGATTAGCGCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACCCTGAGCAGCGGC
AAAGATATTTGGCAGAAACTGAACGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART217 (SEQ ID NO: 47)

ATGTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAAGATGTGATCCATGCGCCATATCT
TGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCACCAAGGCCTTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTGTGGCGCAGCAACGGCA
GGTAATATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAAAGCAA
AAAATCATTTTTCGTAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATACCAAGGACAGTCAAACCAATAGTCAG
CTTTTTAATTATTTTAGAGATAAAGCCTTTCCAAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTCTAG
ATATGTTTATCAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATCAGGACAAGGA
CAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTCACCAGAGGAAACCAGACAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAA
AAAATAAAGGACTAAATGACATCAGCACCATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATA
CCTACGCCAATGTTAGCATTAGCCATGTGATTAACTTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAGGAAACCTTGAGGCC
ATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAAAAAATATTTTGTCGGCATTAATGCTCATGGACAT
GTCGCCATTTCTGCCAAGAAAATAGAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATTAGGCTTATTTACGCTTTCCAGTGG
CAAGGACATTTGGCAGAAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART219 (SEQ ID NO: 48)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAGATCACTTCTGTATGGACCAA
AGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAAGATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGT
ACGATATCACCAAGGCCTTCGATGGGGCGGATAATCTCTTGTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCATTG
GTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAAAGCAAAAAATCATTTTTCGTAAC
CAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATACCAAGGACAGTCAAACCAATAGTCAGCTTTTTAATTATTTTAGA
GATAAAGCCTTTCCAAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTCTAGATATGTTTATCAATGGT
TACTACTTAAATGTGTTTAAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATCAGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATT
TTCGATGCTGTTTTCACCAGAGGAAATCAGACAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAAT
GACATCAGCACCATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGCCAATGTTAG
CATTAGCCATGTGATTAACTTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAGGAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACT
CAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAAAAAATATTTTGTCGGCATTAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCA
AGAAAATAGAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATTAGGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAAGGACATTTGGCAG
AAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART226 (SEQ ID NO: 49)

ATGTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAAGATGTGATCCATGCGCCATATCT
TGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCACCAAGGCCTTCGATGGGGCGGATAATCTCTTGTGTGGCGCAGCAACGGCA
GGTAATATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAAAGCAA
AAAATCATTTTTCGTAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATACCAAGGACAGTCAAACCAATAGTCAG
CTTTTTAATTATTTTAGAGATAAAGCCTTTCCAAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTCTAG
ATATGTTTATCAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATCAGGACAAGGA
CAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTCACCAGAGGAAATCAGACAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAA
AAAATAAAGGACTAAATGACATCAGCACCATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATA
CCTACGCCAATGTTAGCATTAGCCATGTGATTAACTTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAGGAAACCTTGAGGCC
ATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAAAAAATATTTTGTCGGCATTAATGCTCATGGACAT
GTCGCCATTTCTGCCAAGAAAATAGAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATTAGGCTTATTTACGCTTTCCAGTGG
CAAGGACATTTGGCAGAAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART229 (SEQ ID NO: 50)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAGATCACTTCTGTATGGACCAA
AGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAAGATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGT
ACGATATCACCAAGGCCTTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCATTG
GTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAAAGCAAAAAATCATTTTTCGTAAC
CAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATACCAAGGACAGTCAAACCAATAGTCAGCTTTTTAATTATTTTAGA
GATAAAGCCTTTCCAAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTCTAGATATGTTTATCAATGGT
TACTACTTAAATGTGTTTAAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATCAGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATT
TTCGATGCTGTTTTCACCAGAGGAAACCAGACAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAAT
GACATCAGCACCATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGCCAATGTTAG
CATTAGCCATGTGATTAACTTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAGGAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACT
CAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAAAAAATATTTTGTCGGCATTAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCA
AGAAAATAGAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATTAGGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAAGGACATTTGGCAG
AAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART191 (SEQ ID NO: 51)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCAGATTACCAGCGTGTGGACCA
AAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTACCCAGGGCGAAGATGTGTTTCATGCGCCGTATGTGGCGAACC
AGGGCTGGTATGATATTACCAAAGCGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAACA
TGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAGATCAGATTAAACGCTATCTGGAAGAACATCCGGAAAAACAGAAAATT
AACTTTAACGGCGAAAACATGTTTGATGTGAAAAAAGCGATTGATACCAAAAACCATCAGCTGGATAGCAAACTGTTT
AACTATTTTAAAGAAAAAGCGTTTCCGTATCTGAGCGCGAAACATCTGGGCGTGTTTCCGGATCATGTGATTGATATG
TTTATTAACGGCTATCGCCTGAGCCTGACCAACCATGGCCCGACCCCGGTGAAAGAAGGCAGCAAAGATCCGCGC
GGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTACCCGCGGCAACCAGAGCAAACTGCTGACCAGCCGCCATGATTTTAAAAACA
AAAACCTGAACGATATTAGCACCATTATTAAACAGGAACTGACCAAAGGCAAAGCGCTGGGCCTGAGCCATACCTAT
GCGAACGTGCGCATTAACCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTTTAACGCGGAAGGCAACCTGGAAGCGATTT
ATGTGACCGATAGCGATAGCAACGCGAGCATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCGTGAACGCGCATGGCCATGT
GGCGATTAGCGCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACCCTGAGCACCGG
CCAGGATAGCTGGCAGAAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART192 (SEQ ID NO: 52)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCAGATTACCAGCGTGTGGACCA
AAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTACCCAGGGCGAAGATGTGTTTCATGCGCCGTATGTGGCGAACC
AGGGCTGGTATGATATTACCAAAGCGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAACA
TGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAGATCAGATTAAACGCTATCTGGAAGAACATCCGGAAAAACAGAAAATT
AACTTTCGCGGCGAAAACATGTTTGATGTGAAAGAAGCGATTCGCACCAAAAACCATCAGCTGGATAGCAAACTGTT
TGAATATTTTAAAGAAAAAGCGTTTCCGTATCTGAGCGCGAAACATCTGGGCGTGTTTCCGGATCATGTGATTGATAT
GTTTATTAACGGCTATCGCCTGAGCCTGACCAACCATGGCCCGACCCCGGTGAAAAAAGGCAGCAAAGATCCGCGC
GGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTACCCGCGGCAACCAGAGCAAACTGCTGACCAGCCGCCATGATTTTAAAAACA
AAAACCTGAACGATATTAGCACCATTATTAAAAGCGAACTGACCAACGGCAAAGCGCTGGGCCTGAGCCATACCTAT
GCGAACGTGCGCATTAACCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTTTAACGCGGAAGGCAACCTGGAAGCGATTT
ATGTGACCGATAGCGATAGCAACGCGAGCATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCGTGAACAAACATGGCCATGT
GGCGATTAGCGCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACCCTGAGCACCGG
CCAGGATAGCTGGCAGAAACTGAACGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART193 (SEQ ID NO: 53)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCAGATTACCAGCGTGTGGACCA
AAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTACCCAGGGCGAAGATGTGTTTCATGCGCCGTATGTGGCGAACC
AGGGCTGGTATGATATTACCAAAACCTTTAACGGCAAAGATGATCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAACAT
GCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAGATCAGATTAAACGCTATCTGGAAGAACATCCGGAAAAACAGAAAATTA
ACTTTAACGGCGAACAGATGTTTGATGTGAAAGAAGCGATTGATACCAAAAACCATCAGCTGGATAGCAAACTGTTT
GAATATTTTAAAGAAAAAGCGTTTCCGTATCTGAGCACCAAACATCTGGGCGTGTTTCCGGATCATGTGATTGATATG
TTTATTAACGGCTATCGCCTGAGCCTGACCAACCATGGCCCGACCCCGGTGAAAGAAGGCAGCAAAGATCCGCGC
GGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTACCCGCGGCAACCAGAGCAAACTGCTGACCAGCCGCCATGATTTTAAAGAAA
AAAACCTGAAAGAAATTAGCGATCTGATTAAACAGGAACTGACCGAAGGCAAAGCGCTGGGCCTGAGCCATACCTA
TGCGAACGTGCGCATTAACCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTTTGATGCGGAAGGCAACCTGAAAGCGATT
TATGTGACCGATAGCGATAGCAACGCGAGCATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCGTGAACGCGGCGGGCAAAG
TGGCGATTAGCGCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACCCTGAGCACCG
GCCAGGATAGCTGGAACCAGACCAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART194 (SEQ ID NO: 54)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCAGATTACCAGCGTGTGGACCA
AAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTACCCAGGGCGAAGATGTGTTTCATGCGCCGTATGTGGCGAACC
AGGGCTGGTATGATATTACCAAAACCTTTAACGGCAAAGATGATCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAACAT
GCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAGATCAGATTAAACGCTATCTGGAAGAACATCCGGAAAAACAGAAAATTA
ACTTTCGCGGCGAACAGATGTTTGATGTGAAAGAAGCGATTCGCACCAAAAACCATCAGCTGGATAGCAAACTGTTT
GAATATTTTAAAGAAAAAGCGTTTCCGTATCTGAGCACCAAACATCTGGGCGTGTTTCCGGATCATGTGATTGATATG
TTTATTAACGGCTATCGCCTGAGCCTGACCAACCATGGCCCGACCCCGGTGAAAAAAGGCAGCAAAGATCCGCGCG
GCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTACCCGCGGCAACCAGAGCAAACTGCTGACCAGCCGCCATGATTTTAAAGAAAA
AAACCTGAAAGAAATTAGCGATCTGATTAAAGAAGAACTGACCAAAGGCAAAGCGCTGGGCCTGAGCCATACCTATG
CGAACGTGCGCATTAACCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTTTGATGCGGAAGGCAACCTGAAAGCGATTTA
TGTGACCGATAGCGATAGCAACGCGAGCATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCGTGAACAAAGCGGGCAAAGTG
GCGATTAGCGCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACCCTGAGCACCGGC
CAGGATAGCTGGAACCAGACCAACGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART205 (SEQ ID NO: 55)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCAGATTACCAGCGTGTGGACCA
AAGGCGTGACCCCGCCGGAACAGTTTACTCAAGGTGAAGATGTGATTCATGCGCCGTATGTGGCGAACCAGGGCT
GGTATGATATTACCAAAGCGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAACATGCTGCA
TTGGTGGTTTGATCAGAACAAAGATCAGATTAAACGCTATCTGGAAGAACATCCGGAAAAACAGAAAATTAACTTTCG
CGGCGAACAGATGTTTGATGTGAAAAAAGCGATTGATACCAAAAACCATCAGCTGGATAGCAAACTGTTTAACTATTT
TAAAGAAAAAGCGTTTCCGGGCCTGAGCGCGCGCCGCATTGGCGTGTTTCCGGATCATGTGATTGATATGTTTATTA
ACGGCTATCGCCTGAGCCTGACCAACCATGGCCCGACCCCGGTGAAAGAAGGCAGCAAAGATCCGCGCGGCGGC
ATTTTTGATGCGGTGTTTACCCGCGGCAACCAGAGCAAACTGCTGACCAGCCGCCATGATTTTAAAAACAAAAACCT
GAACGATATTAGCACCATTATTAAACAGGAACTGACCAAAGGCAAAGCGCTGGGCCTGAGCCATACCTATGCGAAC
GTGAGCATTAACCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTTTAACGCGGAAGGCAACCTGGAAGCGATTTATGTGA
CCGATAGCGATAGCAACGCGAGCATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCGTGAACGCGCATGGCCATGTGGCGAT
TAGCGCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACCCTGAGCACCGGCCAGGA
TAGCTGGCAGAAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

Ejemplo 2-Evaluación de potencia (eficacia de división IgG)

ELISA

La actividad se mide utilizando un ensayo de potencia basado en ELISA. El principio del ELISA es recubrir los pozos de una placa de multivaloración con un anticuerpo objetivo (BSA), luego incubar diferentes concentraciones de polipéptido de proteasa de cisteína IgG (prueba o control) con anticuerpo anti-BSA en los pozos, antes de detectar la cantidad de anticuerpo anti-BSA unido a los pozos utilizando un anticuerpo detector. Entre mayor es la concentración de un polipéptido de proteasa de cisteína IgG dado en un pozo, menor es el polipéptido anti-BSA intacto que se unirá al pozo, dando una menor señal. Del mismo modo, un polipéptido de proteasa de cisteína IgG más potente dará una menor señal que un polipéptido de proteasa de cisteína IgG menos potente cuando se presenta en la misma concentración.

El IdeS BX1001865 de referencia se prepara como una serie de valoración en etapas de dilución 1:2 de 320 nM hacia abajo hasta 0.16 nM para permitir la graficación de una curva de calibración estándar para el ensayo. Los resultados alcanzados en el ensayo para múltiples concentraciones conocidas de cada polipéptido probado se comparan contra la sección lineal de la curva de calibración para determinar la concentración del IdeS de referencia que alcanzó la misma potencia. Dividir la concentración conocida de cada polipéptido mediante la concentración equivalente determinada del IdeS de referencia de la curva, produce una puntuación que es el cambio de veces en potencia con relación al IdeS BX1001865 de referencia. Por ejemplo, si el polipéptido de prueba de 5nM alcanza un resultado equivalente a IdeS de 10nM de referencia sobre la curva de calibración, el polipéptido prueba tiene una potencia 2 veces mayor que el IdeS BX1001865 de referencia. Una puntuación media para cambio de veces en potencia con relación al IdeS BX1001865 de referencia se calcula a partir de todas las puntuaciones alcanzadas en diferentes concentraciones para cada polipéptido probado, siempre que caigan dentro de la sección lineal de la curva de calibración. Esto significa que la puntuación se compara luego con la puntuación media alcanzada para los IdeS de referencia pCART124, que se incluyen en cada etapa para habilitar la comparación entre las placas. La puntuación media para pCART124 se divide por la puntuación media para el polipéptido de prueba con el fin de producir una “relación pCART124”, que es efectivamente el cambio veces en potencia con relación al IdeS para cada polipéptido. Esta relación pCART124 puede luego ser visualizada sobre un diagrama de barras.

Resumiendo brevemente el protocolo de laboratorio: se recubren pozos de placas de multivaloración durante la noche con BSA (10 µg/ml), luego se lavan con PBS-T y se bloquean durante 1 hora con gelatina de piel de pescado al 2 % en PBS. Se prepara el polipéptido IdeS BX1001865 como una serie de valoración en las etapas de dilución 1:2 en PBS con 0.1% de gelatina de 320 nM hacia abajo hasta 0.16 nM. Los polipéptidos de prueba y el control pCART124 se preparan luego en cada uno de 15, 7.5, 3.75 y 1.9 nM en PBS con un 0.1% de gelatina. Se agrega una muestra de 50 µl de

polipéptido a cada pozo con 50 µl de anti-BSA de conejo (ACRIS, #R1048P, 10 nM) como sustrato. Las placas se incuban luego a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se lavan con PBS-T. Se agrega anticuerpo específico para Fc anti-conejo de cabra (diluido 30 000x) como un anticuerpo detector y se incuba durante 30 min. La placa se lava y se diluye con 40 000x de peroxidasa de rábano SA (HRP; Pierce) se agrega y se incuba durante 30 min. Las placas se lavan y se desarrollan utilizando Un Componente TMB como un sustrato cromogénico para HRP durante 7 min, se detiene con H_2SO_4 0.5 M de absorbancia (OD) medida en λ = 450 nm. La puntuación media para el cambio de veces en potencia con relación a BX1001865 se determina para cada polipéptido de prueba y para pCART124. La "relación pCART124" para cada polipéptido de prueba se calcula luego como se estableció anteriormente.

La "relación pCART124" resulta para pCART191, 192, 193, 194, 197, 198, 200 y 201 mostradas en la figura 1, junto con el resultado para pCART124. Todos los polipéptidos de ejemplos de la invención mostrados aquí alcanzan por lo menos potencia equivalente con relación al control IdeS (pCART124). pCART194, 197, 200 y 201 todos alcanzan mucha mayor potencia, incluso tan alta como mejora de 8.0 veces sobre el control para pCART197 y pCART201.

En forma interesante pCART200 y 201 implican ambas modificaciones al extremo de terminal N. También, el pCART194 y 197 cada uno tienen modificación en N138R/K. Un cambio a un aminoácido positivo en la posición corresponde a la posición 139 de la SEQ ID NO: 3 que se espera produzca resultados similares a la substitución N138R/K. Las posiciones 138 y 139 se sitúan en el bucle de una estructura de horquilla beta que abarca las posiciones 134 a 144 de la SEQ ID NO: 3. Basado en los resultados obtenidos aquí, se espera que los cambios de aminoácidos positivos en cualquiera o ambas de las posiciones 138 y 139 aumenten la actividad de proteasa de cisteína IgG.

Los resultados para pCART202, 203 y 204 se muestran en la figura 2. pCART203 en particular es aproximadamente 3.5 veces más potente que IdeS. El pCART202 está entre 1 y 1.5 veces más potente que IdeS. pCART204 es de potencia comparable al pCART144.

Visualización de los patrones de división IgG

La eficacia de los diferentes polipéptidos pCART se evalúa adicionalmente mediante visualización en SDS-PAGE de los productos de división producidos mediante una serie de valoración de cada polipéptido en diferentes sustratos. Para probar la eficacia en sustrato IgG puro, se utiliza adalimumab (Humira) para IgG1 y denosumab (XGEVA) para IgG2. Para probar la eficacia en un entorno fisiológico más complejo, también se valoran algunos de los polipéptidos en IgIV (Octagam). Esto permite la evaluación del impacto de neutralización de los anticuerpos anti-IdeS en la actividad de polipéptidos. Los patrones de división para cada polipéptido se comparan con los patrones de división de IdeS (BX1001865 y pCART124) en el mismo sustrato. El protocolo es como sigue:

Para la prueba de IgG pura, cada polipéptido de prueba o control se diluye en una serie de valoración de etapas 1:3 de 6.7 µg/ml hacia abajo hasta 0.04 ng/ml en PBS con 0.05% BSA como proteína de soporte. 25 µl de cada concentración se transfiere a placas de multivaloración y se inicia la reacción de división al agregar 25 µl de Humira o XGEVA (2 mg/ml). De esta manera cada concentración de partida de polipéptido se diluye 1:2 en el pozo, dando una serie de valoración de 3.3 µg/ml hacia abajo hasta 0.02 ng/ml.

Para las pruebas IVIg, cada polipéptido de prueba o control se diluye en una serie de valoración de etapas 1:2 de 30 µg/ml hacia abajo hasta 0.015 ng/ml en PBS con 0.05% BSA como proteína de soporte. Se transfiere 25 µl de cada concentración a múltiples placas de valoración y la reacción de división se inicia al agregar 25 µl de 10 mg/ml de IVIg. De esta manera cada concentración de partida de polipéptido se diluye 1:2 en el pozo, dando una serie de valoración de 15 µg/ml hacia abajo hasta 0.0075 ng/ml.

Las placas se incubaron a 37°C durante 1.5 horas. Las muestras se mezclaron 1:4 en regulador de carga SDS X 2 y calienta a 92°C durante 5 min. Se cargan 10 µL sobre gel de poliacrilamida (15 pozo 4-20% de gel prefundido Mini-PROTEAN® TGX™ Biorad) que se lee de acuerdo con los protocolos estándar.

La figura 3 muestra los patrones de división producidos con sustrato IgG1 para pCART202, 203 y 204 según se compara con ambos controles IdeS (pCART124 y BX1001865) e IdeZ (pCART144). Las concentraciones de enzima van de 3,33 µg/ml (línea 1) hacia abajo hasta 0.02 ng/ml (línea 12) en una serie de dilución de etapa 1:3. En la línea 13 se muestra Adalimumab intacto (sin enzima). Las flechas a la derecha indican los diferentes puntos de división de IgG. Flecha 1: IgG intacta; flecha 2: scIgG (IgG dividido individual– resulta de la división de la primera cadena pesada IgG); flecha 3: fragmento $F(ab')_2$ (resultados de división de la segunda cadena pesada IgG). Se agregan líneas verticales para facilitar la comparación en la primera cadena pesada IgG, en el que el IgG intacto se vuelve scIgG (entre la línea 6 y 7) y la segunda división de la cadena pesada de IgG, en donde el scIgG se vuelve el fragmento $F(ab')_2$ (entre las líneas 2 y 3).

La enzima IdeZ (pCART144) tiene menor eficacia de división tanto de la 1ª y 2ª cadena pesada de IgG. El IdeS (BX1001865 y pCART124) son aproximadamente 3 veces más efectivos (es decir, una etapa de valoración) que el pCART144 en división de ambas cadenas. La división en 1.5 ng/ml (línea 8) para IdeS (BX1001865 y pCART124) igual a la división pCART144 (IdeZ) en 4,6 ng/ml (línea 7). El BX1001865 y pCART124 muestran bandas scIGg intensas

(flecha 2) en 4.6 ng/ml (línea 7) mientras que el pCART144 solo tiene una banda scIgG débil (flecha 2) en esta concentración (Línea 7).

De manera importante, tanto el pCART202 y pCART203 muestran aumento de potencia en división de IgG (línea 7 y línea 3) en comparación con IdeZ (pCART144), que resulta en bandas de scIgG más intensas (flecha 2) y bandas F(ab') 2 más intensas (flecha 3). No se observa aumento de eficacia la enzima pCART204. La eficacia de pCART202 en dividir la 2ª cadena pesada se muestra que es aproximadamente igual que para IdeS (BX1001865 y pCART124) (Compare línea 3). El pCART202 es menos efectivo que el IdeS, pero más efectivo que el pCART144 para la primera división de cadena pesada IgG 1 (compare línea 7). La enzima PCART203 posee incluso mayor eficacia que el IdeS en división de principalmente la 2ª cadena pesada, que resulta en una banda $F(ab')_2$ más intensa (flecha 3) y una banda scIgG más débil (flecha 2) en comparación con BX1001865 y pCART124 (flecha 3 y 2) en 0.37 µg/ml (línea 3).

De esta manera, figura 3 en general muestra que una modificación de la secuencia IdeZ con las siguientes modificaciones R70T, Y71del, N72Q, N73G, vista tanto en pCART202 como en pCART203, aumenta la eficacia de división de la 2ª cadena pesada IgG en comparación con pCART144 (IdeZ). La introducción en adición de la modificación L64_T65del también aumenta la eficacia de la división de la primera cadena pesada, vista para pCART203.

La figura 4 muestra los patrones de división producidos con el sustrato IgIV para pCART202, 203 y 204 en comparación con controles IdeS (pCART124 y BX1001865) y IdeZ (pCART144). Las concentraciones de enzima van desde 30 µg/ml (línea 1) hacia abajo hasta 0.015 ng/ml (línea 12) en una serie de diluciones de etapa 1:2. El IgIV intacto (sin enzima) se muestra en línea 13, con la excepción de la imagen para pCART203, de la cual está línea es ausente. Las flechas a la derecha indican los diferentes productos de división de IgG. Flecha 1: IgG intacto; flecha 2: scIgG (IgG sencillo dividió – resulta de la división de la primera cadena pesada IgG); flecha 3: fragmento $F(ab')_2$ (resultados la división de la segunda cadena pesada IgG). Se agregan líneas verticales para facilitar la comparación de la primera división de cadena pesada IgG, en el que el IgG intacto se vuelve scIgG (entre la línea 6 y 7) y la segunda división de cadena pesada IgG, en donde scIgG se vuelve el fragmento F(ab')2 (entre las líneas 2 y 3).

La enzima pCART144 (IdeZ) muestra división más efectiva en la primera cadena pesada IgG 1 (línea 6) en comparación con IdeS (BX1001865 y pCART124), que resulta en una banda scIgG más intenso (flecha 2) y una banda más débil de IgG intacto (flecha 1). Esto se debe más probablemente a un menor nivel de unión al neutralizar de los anticuerpos anti-IdeS para pCART144 (IdeZ) en comparación con su reconocimiento de IdeS. Como se ve para pCART202, pCART203 y pCART204 el aumento de eficacia en la primera división de cadena pesada es cierta para todas las enzimas derivadas IdeZ (línea 6). Las concentraciones de 0,94 ng/ml (línea 6) para pCART202, pCART203 y pCART204 resultan en una banda intensa de scIgG (flecha 2), con la mayoría de IgG divididos sencillas, mientras que la misma concentración de IdeS resulta en menos del 50% de scIgG (línea 6).

Sin embargo, el pCART144 (IdeZ) es peor en la división de la segunda cadena pesada en comparación con IdeS (BX1001865 y pCART124). Esto resulta en una banda scIgG más intensa (flecha 2) de la línea 5 (1,9 ng/ml de enzima) y también en las líneas 4 y 3, en comparación con IdeS para el cual continua la división para las bandas $F(ab')_2$ (flecha 3) ya en la siguiente etapa de valoración (línea 4, 3.75 µg/ml). Notablemente, el pCART203 muestra una capacidad comparable con IdeS (BX1001865 y pCART124) en el segundo sitio de división (línea de 2, 3 y 4) y una mayor eficacia de división que la IdeS e IdeZ (pCART144) en el primer sitio de división (línea 7).

La enzima PCART203 muestra división IgG de 0,5 ng/ml (línea 7) y tiene scIgG principalmente generado (flecha 2) en aproximadamente 0,9 ng/ml (línea 6). Esto corresponde a un aumento de eficacia de dos veces en comparación IdeS, que inicia la división en 0,9 ng/ml (línea 6) y tiene una banda scIgG de dominación en 1,9 ng/ml (línea 5). La figura 4 muestra en general, que modificar la IdeZ con las modificaciones L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q y N73G aumenta la eficacia de la división del IgG humano incluso en la presencia de ADA neutralizante. Esto se observa claramente en pCART203 según se compara con el IdeS.

La figura 5 muestra patrones de división producidos con el sustrato IgG1 para pCART205, 206, 207, 208 y 210 en comparación con los controles IdeS (pCART124 y BX1001865) e IdeZ (pCART144). Las concentraciones de enzima van desde 3,33 µg/ml (línea 1) hacia abajo a 0.02 ng/ml (línea 12) en una serie de diluciones de etapa 1:3. Las flechas a la derecha indican los diferentes productos de división de IgG. Flecha 1: IgG intact0; flecha 2: scIgG (IgG dividido sencillo – resulta de la división de la primera cadena pesada IgG); flecha 3: fragmento $F(ab')_2$ (resulta de la división la segunda cadena pesada IgG). Las líneas verticales se agregan para facilitar la comparación en la primera división de cadena pesada IgG, en el que el IgG intacto se vuelve scIgG (entre las líneas 6 y 7) y la segunda división de cadena pesada IgG, en el que el scIgG se vuelve el fragmento F(ab')2 (entre la línea 2 y 3).

La enzima pCART205 muestra un aumento de capacidad en comparación con pCART144 (IdeZ) en la división de cadenas pesadas IgG (línea 6 y 3), que resulta en una banda scIgG más intensa (flecha 2, línea 6) y una banda muy débil de IgG intacto (flecha 1, línea 6) y una banda $F(ab')_2$ más intensa (flecha 3, línea 3) en comparación con pCART144 (IdeZ) (línea 6 y 3). Sin embargo, en ausencia del ADA neutralizante en este experimento (en contraste con aquel mostrado en la figura 4), la actividad de división IdeS (pCART124) para IgG1 puro es mayor que pCART205.

Los polipéptidos PCART207 y pCART210 ambos muestran aumento de eficacia de división IgG en comparación con ambos IdeS (pCART124) e IdeZ (pCART144) (línea 7 para la primera división y línea 3 para la segunda división). La enzima más potente, pCART207, muestra un aumento de eficacia aproximado de 3 veces en la división de las cadenas IgG pesadas en comparación con IdeS (pCART124). La conversión completa a scIgG (flecha 2) para pCART124 se obtiene en 14 ng/ml (línea 6) mientras que para pCART207 ya se observa una banda scIgG sencilla (flecha 2) en 4.6 ng/ml (línea 7). Un mayor aumento en la eficacia para pCART207 en comparación con pCART124 se observa en la división de la segunda cadena pesada. Se observa una banda de $F(ab')_2$ más intensa (flecha 3) para pCART207 en 41 ng/ml (línea 4) que lo que se muestra para pCART124 en 0.37 µg/ml (línea 3).

PCART207 y pCART210 comparten las siguientes modificaciones con relación a la secuencia IdeZ: L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R. De esta manera la figura 5 muestra en general que estos cambios aumentan la eficacia de la división del IgG1 humano.

La figura 6 muestra patrones de división producidos con el sustrato de IgG2 para pCART203, 205, 206, 207, 208 y 210 cuando se compara con IdeS de control (pCART124 y BX1001865) e IdeZ (pCART144). Las concentraciones de enzima van desde 3,33 µg/ml (línea 1) hacia abajo hasta 0.02 ng/ml (línea 12) en una serie de dilución de etapa 1:3. Las flechas a la derecha indican los diferentes productos de división de IgG. Flecha 1: IgG intacto; flecha 2: scIgG (IgG dividido sencillo, resulta de la división de la primera cadena pesada IgG); flecha 3: fragmento $F(ab')_2$ (resulta de la división de segunda cadena pesada IgG). Las líneas verticales se agregan para facilitar la comparación en la primera división de cadena pesada de IgG, en el que el IgG intacto se vuelve scIgG (entre la línea 6 y 7) y en la segunda división de la cadena pesada IgG, en el que el scIgG se vuelve el fragmento $F(ab')_2$ (entre la línea 2 y 3).

Las enzimas pCART203 y pCART207 muestran ambas un aumento aproximado de 3 veces en la eficacia de división en comparación con pCART144 (IdeZ). El pCART144 muestra una única banda scIgG intensa (flecha 2) en una concentración de 0.12 µg/ml (línea 4), en comparación con una banda scIgG dominante (flecha 2) para pCART203 y pCART207 en concentración inferior de 41 ng/ml (línea 5). pCART203 y pCART207 son comparables con IdeS (BX1001865 y pCART124) en eficacia de división tanto de la primera y segunda cadenas pesadas IgG (línea 6 y línea 2). Sin embargo, en ausencia de un ADA neutralizante en este experimento (encontraste aquel mostrado en la figura 4), la actividad de división IdeS (pCART124) es mayor que cada uno de pCART206, pCART208 y pCART210 para ambas cadenas pesadas de IgG2 puro. Esto se puede observar a partir la banda scIgG intensa sencilla (flecha 2) presente incluso en la concentración más alta de enzima 3.3 µg/ml (línea 1) para pCART206 y pCART208. pCART205 se deriva del IdeS/Z híbrido (pCART145) tiene aproximadamente la misma eficacia que IdeZ (pCART144) en división de IgG2 humano puro (línea 5 para el primer sitio de división y línea 2 para el segundo tipo de división) resultando ambos en una única banda scIgG (flecha 2) en 0.12 µg/ml (línea 4) y una banda dominante de $F(ab')_2$ en la concentración más alta de 3.3 µg/ml (línea 1).

El general, la figura 6 muestra que las mejores modificaciones de IdeZ, es decir, que resultan en el mayor aumento de eficacia en la división IgG2, fueron aquellas encontradas en pCART203 y pCART207. Estas enzimas comparten las modificaciones L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, con pCART207 que poseen adicionalmente la modificación N138R.

La figura 7 muestra los patrones de división producidos con el sustrato IgIV para pCART207, 208 y 210 en comparación con IdeS de control (BX1001865). Las concentraciones de enzima van de 30 µg/ml (línea 1) hacía abajo hasta 0.015 ng/ml (línea 12) en una serie de diluciones de etapa 1:2. El IgIV intacto (sin enzima) se muestra en la línea 13. Las flechas a la derecha indican la división diferente de productos de IgG. Flecha 1: IgG intacto; flecha 2: scIgG (IgG dividido sencillo, resulta de la división de la primera cadena pesada IgG); flecha 3: fragmento $F(ab')_2$ (resulta de la división de la segunda cadena pesada IgG). Se agregan líneas verticales para facilitar la comparación en la primera división de cadena pesada IgG, en el que IgG intacto se vuelve scIgG (entre la línea 6 y 7) y la segunda división de cadena pesada de IgG, mientras que el scIgG se vuelve el fragmento $F(ab')_2$ (entre las líneas 2 y 3).

pCART207, pCART208 y pCART210 muestran todos, aumento de eficacia en comparación con IdeS (BX1001865) en la división de la primera cadena pesada IgG (línea 6). El IdeS (BX1001865) ha generado principalmente scIgG (flecha 2) en una concentración de 1.9 ng/ml (línea 5). Resultados similares se obtienen en 0.9 ng/ml (línea 6) para pCART207 y pCART210, y en sólo 0.5 ng/ml (línea 7) para pCART208. En el caso de pCART208 esto es aproximadamente un aumento de 4 veces en la eficacia de división de la primera cadena pesada. En la división de la segunda cadena pesada pCART208 muestra un aumento de eficacia de división, que resulta en una banda $F(ab')_2$ dominante (flecha 3) en 1.9 ng/ml (línea 5), mientras que IdeS (BX1001865) sólo ha generado scIgG (flecha 2) en la misma concentración.

En general, la figura 7 muestra que pCART207, pCART208 y pCART210 tienen aumento de eficacia de división de IgG humano en la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-IdeS (ADA), en comparación con IdeS. Se obtiene un resultado similar para pCART206 (datos no mostrados). pCART206, 207, 208 y 210 todos comparten las siguientes modificaciones con relación a la secuencia IdeZ: L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q y N73G. Adicionalmente, pCART207, 208 y 210 también comparten la modificación N138R. De esta manera, la figura 7 también confirma que estas diferentes modificaciones aumentan la eficacia de la división del IgG humano en la presencia de ADA neutralizante.

Ejemplo 3 – Evaluación de inmunogenicidad

Ensayo de anticuerpo anti-IdeS competitivo

Este ensayo se basa en la competición entre un polipéptido de prueba e IdeS para unión a un anticuerpo anti-IdeS. Una preincubación de enzima de prueba e IVIg permitirá la unión de anticuerpos anti-IdeS a la enzima pCART probada. Después de eso se agrega la mezcla IVIg-enzima a una placa recubierta con IdeS y cualquier anticuerpo anti-IdeS que no se une al polipéptido de prueba se unirá en cambio al IdeS en la placa. Se hacen todas las incubaciones de unión en la presencia de ácido acético 2 mM (IHAc) para inhibir la IgG y en alta sal de tal manera que sólo ocurre la unión de alta afinidad. Después de lavar, se utiliza un fragmento $F(ab')_2$ específico de $F(ab')_2$ antihumano de cabra biotinilado como detector. El pobre reconocimiento del polipéptido de prueba por los anticuerpos anti-IdeS en IVIg resultará en alta unión de los anticuerpos anti-IdeS en IVIg para la placa, dando una alta señal. El buen reconocimiento del polipéptido de prueba por los anticuerpos anti-IdeS en IVIg dará el resultado de oposición. El protocolo detallado como sigue:

IdeS de referencia (BX1001865) se recubre durante la noche en placas de multivaloración (5 µg/ml), luego se lavan con PBS-T y se bloquean durante 1 hora con BSA al 2% en PBS complementado con 2 mM IHAc y NaCl 1 M de. Se prepara una placa de mezcla con diluciones en forma de etapas del polipéptido de prueba y 20 µg/ml de IVIg en PBS complementado con BSA al 0,1%, IHAc de 2 mM y NaCl 1 M. La placa de mezcla se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador. Después de incubación, se deshecha la solución de bloqueo de la placa recubierta con IdeS y se transfiere 50 µl de cada mezcla de la placa de mezcla a los pozos de la placa recubierta. Después de incubación durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador, la placa se lava con PBS-T y un detector, se agrega un fragmento $F(ab')_2$ específico de $F(ab')_2$ antihumano de cabra biotinilado (diluido 20000x). Después de incubación durante 30 minutos la placa se lava y se agrega 40 000x de SA-HRP (Pierce) diluido y se incuba durante 30 min. La placa se lava y se desarrolla utilizando TMB One Component como un sustrato cromogénico para HRP durante 7 min, se detiene con H_2SO_4 0.5 M. Se mide la absorbancia (OD) en λ = 450 nm. Los resultados se invierten (valor 1/OD) y se presentan como una relación en comparación con pCART124 (1/(polipéptido de prueba /pCART124)) para la visualización en diagramas de barras.

Los resultados para pCART191, 192, 193, 194, 197, 198, 200 y 201 se muestran en la figura 8. Los resultados de pCART202, 203 y 204 se muestran en la figura 9. Todos los polipéptidos probados muestran considerable reducción en reconocimiento de anticuerpos anti-IdeS en comparación con IdeS. El polipéptido que muestra la última reducción (pCART193) se reconoce en un nivel de aproximadamente 60% menos que IdeS. El resto de polipéptidos probados fueron 70 o incluso 80% menores que IdeS.

Ensayo de valoración anti-IdeS

Este ensayo se basa en comparar valoraciones de dilución IVIg. Diferentes polipéptidos de prueba y control IdeS (BX10018865 y pCART124) se recubren en placas de microvaloración. La unión de los anticuerpos anti-IdeS a los polipéptidos de prueba o controles se evalúa al agregar cantidades valoradas de IgIV (series de dilución de etapa 1:2 de 40 a 0.625 µg/ml es decir, en valoraciones que corresponden a 1:250 hacia abajo hasta 1:16000 de suero diluido) a las placas. El regulador de dilución es una concentración rica en sal de tal manera que solo ocurre alta afinidad de unión e incluye IHAc 2 mM para inhibir la división de IgG y rico en sal de tal manera que sólo ocurre unión de alta afinidad. Un corte de valor OD se fija en cada experimento en aproximadamente 3 veces el blanco. El resultado documentado para el polipéptido probado fue la valoración de dilución de IgIV que dio los más bajos valores OD (unión más baja de anticuerpo anti-IdeS) por encima del corte. En otras palabras; se necesita IVIg menos diluido para polipéptidos con bajo reconocimiento por anticuerpos anti-IdeS (ADA) y se necesitan IVIg más diluidos para enzimas que son altamente reconocidas por la ADA. En Resumen, el protocolo es como sigue:

IdeS de referencia y cada enzima de prueba se recubren durante la noche en placas de multivaloración (2 µg/ml), se lavan con PBS-T y se bloquean durante 1 hora con BSA al 2% y PBS complementado con IHAc 2 mM. La solución de bloqueo se deshecha desde y se agrega 50 µl de diluciones en forma de etapas de IVIg (regulador de dilución: NaCl 1M PBS + BSA al 0.1% + IHAc 2mM) y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador. Las placas se lavan con PBS-T y un detector, se agrega fragmento $F(ab')_2$ específico de $F(ab')_2$ antihumano de cabra biotinilado (diluido 20 000x) e incubado durante 30 min. Las placas se lavan y se agrega SA-HRP (Pierce) diluido 40 000x e incubado durante 30 min. La placa se lava y se desarrolla utilizando TMB One Component como un sustrato cromogénico para HRP durante 7 min, se detiene con H_2SO_4 0.5 M, se mide la absorbancia (OD) en λ = 450 nm.

Los resultados para pCART202, 203 y 204 se muestran en la figura 10. Todos los tres polipéptidos probados dieron puntajes de diluciones 3x menores que IdeS para reconocimiento por anticuerpos anti-IdeS.

Los resultados para pCART205, 206, 207, 208 y 210 se muestran en la figura 11. Todos excepto los pCART206 dieron puntuaciones de diluciones 3x menores que el IdeS para reconocimiento por anticuerpos anti-IdeS. Los pCART206 dieron puntuaciones de diluciones 2x menores. En general, los polipéptidos ensayados claramente son menores inmunogénicos que IdeS.

Resumen

Los polipéptidos probados son en general más efectivos en dividir el IgG humano que el IdeZ y/o son por lo menos tan efectivos en dividir el IgG humano como el IdeS, y también normalmente menos inmunogénicos que el IdeS.

Ejemplo 4 – Evaluación de potencia

ELISA de potencia

Para superar la capacidad de división del IgG1 e IgG2 humano, se establecen dos ensayos de potencia basados en ELISA. Un ensayo mide la división IgG1 y el otro la división IgG2. Se calculan los valores EC50 (concentración efectiva máxima media) para los diferentes polipéptidos de proteasa de cisteína IgG ensayados. El principio de los ensayos fue recubrir los pozos de una placa de multivaloración con un fragmento $F(ab)_2$ dirigido a anticuerpos IgG humano con especificidad a la región Fab. Luego las concentraciones valoradas del polipéptido de proteasa de cisteína IgG (prueba o control) se incuban juntos con anticuerpo IgG1 humano (Humira) o anticuerpo IgG2 humano (XGEVA) en los pozos. La cantidad de IgG humano dividido sencillo o intacto (Humira o XGEVA) unido a los pozos se mide utilizando un anticuerpo detector dirigido a IgG humano con especificidad contra la parte Fc del anticuerpo. Entre mayor es la concentración de un polipéptido de proteasa de cisteína IgG dado en un pozo, menor es el anticuerpo IgG humano intacto que se unirá al pozo, dando una menor señal. Del mismo modo, entre más potente sea polipéptido de proteasa de cisteína IgG dará una menor señal que un polipéptido de proteasa de cisteína IgG menos potente cuando se presenta en la misma concentración. Se preparan curvas de valoración de respuesta de dosis para el control IdeS (pCART124) y todos los polipéptidos de proteasa de cisteína IgG probados, en ambos ensayos IgG1 (humira) e IgG2 (XGEVA). Los valores EC50 también se calculan para cada variante probada, que representa la concentración de un polipéptido en donde el 50% de su efecto máximo, en la segunda división de cadena pesada de la molécula IgG, se observa, es decir, la concentración, en donde la mitad de las moléculas IgG se dividen individualmente y la mitad se dividen completamente. Un menor valor de EC50 representa una proteasa de cisteína IgG más efectiva. La división de la primera cadena pesada IgG, IgG a scIgG, no es visible en este ensayo porque la parte Fc del IgG está aún presente y se puede detectar para el anticuerpo detector específico Fc (Figura 18).

Breve resumen del Protocolo de laboratorio: se recubren pozos de placas de multivaloración durante la noche (+ 2-8 ° C) con fragmento $F(ab)_2$ específico de Fab antihumano de cabra (0.5 µg/ml) (Jackson #109-006-097), luego se lava con PBS+0.05% Tween 20 (PBS-T) y se bloquea en 0.45% de gelatina de pescado en PBS-T (regulador de bloque) durante 45-120 min a temperatura ambiente. El IdeS de control (pCART124) y los polipéptidos de proteasa de cisteína IgG que se van a probar se preparan como series de valoración en etapas de dilución 1:4 en regulador de bloque con una concentración de partida de 80 µg/ml. Se agregan volúmenes iguales (25 µl) de IgG1 humano (Humira) en una concentración de 0.5 µg/ml y las cantidades valoradas de polipéptidos de proteasa de cisteína IgG a pozos y se incuban 2 horas con agitación en un ambiente de temperatura controlada a 37°C y luego se lavan con PBS-T. Se mezcla anticuerpo específico Fc IgG anti humano de ratón biotinilado (m-a-hIgG Bio II, lote: C0013-ZC43C, Southern Biotech) (600 ng/ml) con Strep-sulfo (200 ng/ml) y se agrega a placas de multivaloración. Las placas se sellan con cinta de aluminio y se incuban a + 25°C durante 1 hora con agitación. Luego las placas se lavan en PBS-T y se agrega 150 µL de regulador de Lectura T diluido 2x (regulador de Lectura T MSD, cat no. R92TC-2) a cada pozo. Las placas se leen inmediatamente en un lector de Placa, MSD (Meso Scale Discovery) QuickPlex SQ 120 Model 1300.

La eficacia de los ensayos se visualiza en gel: El ensayo se conduce como se describe en el ejemplo 2 para división de IgG1 (Humira), IgG2 (XGEVA) así como división de un grupo IgG antihumano, IVIg (Octagam).

Resultados

ELISA de potencia

En la figura 12 y figura 13 se muestran los resultados de las curvas de respuesta de dosis para las proteasas de cisteína IgG probadas en los ensayos de potencia (división IgG1) (división IgG2). El pCART207, 217, 219 de los polipéptidos de ejemplo de la invención probados tienen potencia mejorada (reducción de valores EC50) en división de cadenas pesadas de IgG1 (figura 12) en comparación con pCART124 de control IdeS (tabla 1), con una mejora de dobles en potencia de 1.4 para pCART219, 3.2 para pCART217 y a lo sumo tanto como 4.0 para pCART207. pCART226 muestra una menor potencia que IdeS (pCART124) con una diferencia de doblez en EC50 de 0.6 (tabla 1). Para división de IgG2 (figura 13) todos los polipéptidos probados muestran una menor potencia en comparación con los IdeS originales (pCART124), con mayores valores EC50 (tabla 1) y una diferencia por debajo de 1, en división de la segunda cadena pesada IgG. Sin embargo, todos los polipéptidos probados son más potentes que pCART144 (SEQ ID NO: 27) (datos no mostrados) que es la secuencia de los polipéptidos de proteasa de cisteína IgG de la invención de la que se derivan.

Ensayos de eficacia visualizados en gel

La división de IgG1 (figura 14A) e IgG2 (figura 14B) visualizados en gel muestran claramente la primera y segunda división de cadena pesada (las líneas verticales en las figuras marcan la primera y segunda división de cadena pesada IgG por división de BX1001865 y pCART124). El * en las figuras ilustran el valor CE50 aproximado, es decir, la concentración en donde 50% del IgG se divide individualmente (scIgG) y el 50% se divide completamente ($F(ab')_2$). Los datos de los geles se resumen en la tabla 2 (división IgG1) y la tabla 3 (división IgG2). La división de la primera cadena

pesada de IgG1 (Humira) es aproximadamente la misma, 1.5 ng/ml para IdeS (pCART124 y BX1001865), pCART207 y 217 pero se necesita una concentración algo mayor para obtener una banda scIgG dominante, aproximadamente 4.6, para pCART219 y 226 (tabla 2). Sin embargo, para la segunda división de cadena pesada de IgG1 pCART207, 217 y 219 todos demuestran mayor eficacia que IdeS (pCART124 y BX1001864) (tabla 2), aproximadamente 3x (una etapa de valoración) más efectiva en división, aproximadamente 370 ng/ml para IdeS y aproximadamente 120 ng/ml para pCART207, 217 y 219. En división de IgG2 (XGEVA) (figura 14B) pCART207, 217, 219 también muestran una etapa de valoración (1:3) de menor eficacia y pCART226 tiene aproximadamente dos etapas de valoración (1:6) menor eficacia en comparación con IdeS en la división de ambas primera y segunda cadena pesada (tabla 3). pCART229 muestra aproximadamente la misma eficacia que IdeS (BX1001865 y pCART124) en la división de la primera (4.6 ng/ml) y segunda (370 ng/ml) IgG de cadena pesada de IgG1 (Humira) (figura 15A y tabla 4), mientras que la división de IgG2 (XGEVA) en pCART229 es aproximadamente una etapa de valoración (1:3) menos efectiva que IdeS en división tanto de la primera como segunda cadena pesada IgG (figura 15 y tabla 4).

Los polipéptidos de proteasa de cisteína IgG pCART207, 217, 219 y 226 también se valoran en el grupo IgG humano, IVIg (Octagam) con IdeS (BX1001865) como control (figura 16). Todos ellos muestran una mayor eficacia en división de la primera cadena pesada IgG de IVIg en comparación con IdeS. pCART207, 217, 219 y 226 todos necesitan 0.75 µg/ml para alcanzar la primera división mientras que IdeS (BX1001865) necesita 1.5 µg/ml para generar scIgG (figura 16 y tabla 5). En la segunda división pCART207 y 217 ambos son más eficientes que IdeS (BX1001865) con una concentración de 3 µg/ml para generar predominantemente fragmentos $F(ab')_2$ e IdeS necesita aproximadamente 6 µg/ml (figura 16 y tabla 5). pCART219 y 226 ambos son menos efectivos en comparación con IdeS en la segunda división del grupo IgG IVIg. La división de IgIV en pCART229 se analiza en un espectro de valoración más amplio con 1:2 diluciones de 30 µg/ml (figura 17) en comparación con los polipéptidos probados en la figura 16. La misma eficacia se ve para IdeS (BX1001865 y pCART124) y pCART229 (figura 17) con una concentración de 1.9 µg/ml para generar scIgG y 7.5 µg/ml para dar fragmentos $F(ab')_2$ (tabla 6).

Resumen de las figuras para ejemplo 4

Figura 12. Curvas de valoración para división de IgG1 (Humira) mediante diferentes polipéptidos de proteasa de cisteína IgG.

Figura 13. Curvas de valoración para división de IgG2 (XGEVA) mediante diferentes polipéptidos de proteasa de cisteína IgG.

Figura 14. División IgG analizada por SDS-PAGE utilizando cantidades valoradas (dilución 1:3 de 3300 ng/ml) de pCART207, 217, 219 y 226 con BX1001865 y pCART124 (IdeS original) como controles en el mismo experimento de división. A: división de humira (IgG1) y B: división de XGEVA (IgG2). Las líneas verticales marcan las concentraciones IdeS (BX1001865 y pCART124) necesarias para dar la primera y segunda divisiones de cadena pesada IgG (en el que la cantidad del producto dividido domina sobre el producto no dividido). El * en la figura marca el valor CE50 aproximado en este experimento.

Figura 15. División IgG analizada por SDS-PAGE utilizando cantidades valoradas (dilución 1:3 de 3300 ng/ml) de pCART229 con BX1001865 y pCART124 (IdeS original) como controles en el mismo experimento de división. A: división de humira (IgG1) y B: división de XGEVA (IgG2). Las líneas verticales marcan las concentraciones IdeS (BX1001865 y pCART124) necesarias para dar la primera y segunda divisiones de cadena pesada IgG (en el que la cantidad de producto dividido domina sobre el producto no dividido).

Figura 16. División IVIg analizada por SDS-PAGE utilizando graduado cantidades valoradas (dilución 1:2 de 6 µg/ml) de los polipéptidos de proteasa de cisteína IgG probados e IdeS (BX1001865) como control en el mismo experimento de división.

Figura 17. División IVIg analizada por SDS-PAGE utilizando cantidades valoradas (dilución 1:2 de 30 µg/ml) de pCART229 con BX1001865 y pCART124 (IdeS original) como controles en el mismo experimento división.

Figura 18. Representación esquemática de la división de inmunoglobulinas mediante polipéptidos de la invención. La división enzimática del IgG se realiza en dos etapas. Primero, una cadena pesada de IgG intacta se divide y solo se genera un único IgG dividido (scIgG). En segundo lugar, se divide la siguiente cadena pesada y se libera la parte Fc. La parte Fc se une todavía a la parte Fab en la segunda molécula scIgG y por lo tanto el anticuerpo detector en el ELISA de potencia es reconocer la parte Fc de la molécula IgG, el ensayo no diferenciará entre el IgG completo del scIgG.

Discusión y conclusión

Los valores EC50 inferiores de pCART207, 217, 219 en el ELISA de potencia Humira demuestra una potencia mejorada en la segunda división (desde scIgG hasta $F(ab')_2$) de IgG1 en comparación con pCART124 (IdeS original). La actividad algo inferior del pCART226 en división de IgG1 se muestra tanto en el ELISA de potencia Humira como en el ensayo de eficacia Humira analizado por SDS-PAGE.

Se demuestra en el ELISA de potencia XGEVA que todos los polipéptidos probados pCART207, 217, 219 y 226 tienen una menor potencia en comparación con IdeS (pCART124) en división de ambas cadenas pesadas IgG de IgG2. Sin embargo, cuando se visualiza la división en gel en cambio es claro que pCART207 tiene aproximadamente la misma actividad que IdeS (BX1001865 y pCART124) en la primera división de cadena pesada IgG, mientras que es aproximadamente 3 veces menos efectivo (una etapa de valoración) en la segunda división en comparación con IdeS. Se observa el mismo patrón para pCART229 con una alta eficacia en división de IgG1, que se puede comparar con la actividad de IdeS, pero con una menor eficacia para división de IgG2, principalmente el corte de la segunda cadena pesada IgG. Al analizar la división IgG en gel, el corte de la primera cadena pesada (de IgG a scIgG) se hace evidente, esta división es invisible en el ELISA de potencia utilizando un anticuerpo detector específico Fc. La mayoría de acciones mediadas por Fc de IgG ya se pierden en una única molécula dividida (datos no mostrados), que es central en una situación clínica en donde el foco principal es incapacitar las moléculas IgG patogénicas.

El IVIg es un grupo IgG humano que contiene aproximadamente 65-70% IgG1, 35-30% IgG2 e IgG3/IgG4 que comparten aproximadamente 1%. El IVIg humano también contiene naturalmente anticuerpos anti-IdeS, del anterior donante IgG expuesto a S. pyogenes, algunos de estos anticuerpos serán neutralizantes, es decir, la unión de estos anticuerpos específicos IdeS a IdeS disminuirá o demolerá completamente la actividad proteasa IdeS IgG. Los resultados de la división IgIV mediante los diferentes polipéptidos de proteasa de cisteína IgG exhiben por lo tanto división general de las cuatro subclases IgG humanas en aproximadamente su relación normal en suero humano, sino también en la presencia de anticuerpos anti-IdeS neutralizantes.

En general todos los polipéptidos de proteasa de cisteína IgG probados tienen una menor eficacia en la división IgG2 en comparación con IgG1. pCART207, 217 y 219 son más eficientes que IdeS en dividir IgG1 pero menos eficiente en dividir principalmente la segunda cadena pesada de IgG2. Las bandas scIgG vistas en la figura 16 en mayores dosis (6 µg/ml) de pCART207, 217, 219 y 226 y en la figura 17 para pCART229 probable representan más las moléculas IgG2 en el grupo IgG, IVIg (compara la figura 14A con 14B y 15A con 15B).

Tabla 1. EC50 (ng/ml) medido mediante ELISA de potencia y diferencia de plegado en potencia en comparación con IdeS original (pCART124).

	EC50 (ng/ml) en división de IgG1 (Humira)	Veces de mejora en potencia	EC50 (ng/ml) en división de IgG2 (XGEVA)	Veces de mejora en potencia
pCART124	258	1	225	1
pCART207	64	4.0	444	0.5
pCART217	82	3.2	486	0.5
pCART219	183	1.4	1508	0.15
pCART226	433	0.6	3156	0.07

Tabla 2. Datos para división IgG1 (Humira) mostrados en gel (figura 14A). Concentración (ng/ml) de polipéptidos necesarios para alcanzar la primera y segunda división IgG, en el que el producto dividido domina en cantidades sobre el no dividido. Valor EC50 aproximado (* en la figura 14A).

ID	Primer IgG de cadena pesada IgG a scIgG Concentración de enzima (ng/ml)	Segundo IgG de cadena pesada scIgG a F(ab')2 Concentración de enzima (ng/ml)	Valor EC50 aproximado, es decir, cantidades iguales de scIgG y F(ab')2 (*) Concentración de enzima (ng/ml)
BX1001865	1.5	370	100
pCART124	1.5	370	100
pCART207	1.5	120	10-40
pCART217	1.5	120	40-100
pCART219	4.5	120	40-100
pCART226	4.5	370	100-400

Tabla 3. Datos para división IgG2 (XGEVA) mostrados en el gel (figura 14B). Concentración (ng/ml) de polipéptidos necesarios para alcanzar primera y segunda división IgG, en el que el producto dividido domina en cantidades sobre el no dividido. Valor EC50 aproximado (* en la figura 14B).

ID	Primer IgG de cadena pesada IgG a scIgG Concentración de enzima (ng/ml)	Segundo IgG de cadena pesada scIgG a F(ab')2 Concentración de enzima (ng/ml)	Valor EC50 aproximado, es decir, cantidades iguales de scIgG y F(ab')2 (*) Concentración de enzima (ng/ml)
BX1001865	14	370	100-400
pCART124	14	370	100-400
pCART207	41	1100	400-1100
pCART217	41	1100	400-1100
pCART219	41	3300	1100
pCART226	120	3300	1100-3300

Tabla 4. Datos para división IgG1 (Humira) e IgG2 (XGEVA) mediante pCART229 mostrado en gel (figura 15). Concentración (ng/ml) de polipéptido necesario para alcanzar primera y segunda división IgG (en el que el producto dividido domina en cantidades por encima del no dividido).

ID	Primera IgG de cadena pesada IgG1 (Humira) para scIgG Concentración de enzima (ng/ml)	Segundo scIgG de cadena pesada IgG1 (Humira) para F(ab')2 Concentración de enzima (ng/ml)	Primer IgG de cadena pesada IgG2 (XGEVA) para scIgG Concentración de enzima (ng/ml)	Segundo scIgG de cadena pesada IgG2 (XGEVA) para F(ab')2 Concentración de enzima (ng/ml)
BX1001865	4.6	370	14	1100
pCART124	4.6	370	14	1100
pCART229	4.6	370	122	3300

Tabla 5. Datos para división IVIg por pCART207, 217, 219 y 226 mostrados en gel (figura 16). Concentración (ng/ml) de polipéptido necesario para alcanzar primera y segunda división IgG, en el que el producto dividido domina en cantidades sobre el no dividido.

ID	Primer IgG de cadena pesada IgG para scIgG Concentración de enzima (ng/ml)	Segundo scIgG de cadena pesada IgG para F(ab')2 Concentración de enzima (ng/ml)
BX1001865	1500	6000
pCART124	1500	6000
pCART207	750	3000
pCART217	750	3000
pCART219	750	6000
pCART226	750	6000

Tabla 6. Datos para división IVIg mediante pCART229 mostrado en gel (figura 17). Concentración (ng/ml) de polipéptido necesario para alcanzar primera y segunda división IgG, en el que el producto dividido domina en cantidades sobre el no dividido.ID	Primer IgG de cadena pesada IgG para scIgG Concentración de enzima (ng/ml)	Segundo scIgG de cadena pesada IgG para F(ab')2 Concentración de enzima (ng/ml)
BX1001865	1900	7500
pCART124	1900	7500
pCART229	1900	7500

Ejemplo 5 - ELISA ADA, un ELISA comparativo para sitios de unión ADA-IdeS.

Se miden sitios de unión de anticuerpo antifármaco (ADA) contra IdeS para detectar polipéptidos modificados con "ADA" de la invención (pCART207, 217, 219 y 226), utilizando un ensayo basado en descubrimiento de Meso escala (MSD), ELISA. El principio de ELISA fue recubrir pozos de una placa de multivaloración con IdeS marcado his (pCART124). La mayor parte de los seres humanos tienen anticuerpos contra IdeS en su suero debido a infecciones anteriores con S. pyogenes. Aquí se utilizan dos grupos de suero humano clínicos diferentes como estándares para detección de ADA. El primer grupo es suero humano normal de un grupo de suero de 100 individuos, denominado grupo de suero humano 1191807, y el segundo es un grupo de suero de pacientes en fase II de estudio 13-HMedIdeS-02, denominado fase II grupo 2. A estos pacientes se les ha administrado IdeS una vez en un rango de dosis de 0.24-0.50 mg/Kg de peso corporal y por lo tanto tienen niveles inducidos (aproximadamente 50 veces) de ADA anti-IdeS en su suero.

El esquema de este ELISA ADA competitivo es que el IdeS (pCART124) está recubierto en el fondo de una placa de microvaloración. Los grupos de suero humano se preincuban juntos con el polipéptido que se va a ensayar para sitios de reconocimiento ADA, o con IdeS de control positivo (pCART124) en una relación molar de 1:100 con exceso 100x del polipéptido probado. La concentración de los dos grupos diferentes de suero utilizados para la incubación se estima a partir de la curva estándar para dar aproximadamente 80% de unión al IdeS original. Si los sitios de unión ADA se han abolidos en los polipéptidos probados, estos polipéptidos no pueden competir con la unión de ADA al IdeS original en el fondo de los pozos, es decir una baja la señal demuestra una fuerte semejanza de Ada con el IdeS original (pCART124) y una alta señal de muestra débil semejanza ADA con el IdeS original.

La concentración de ambos estándares alcanza aproximadamente 80% de unión en la sección lineal de la curva de estándar que es aproximadamente 200 ng de ADA (IdeS)/ml. En la preincubación competitiva esta concentración de ambos estándares se utiliza por separado y la concentración de polipéptidos de proteasa de cisteína IgG se utilizan en una relación de 100 veces la concentración ADA, que incluyen la diferencia de peso molar entre un anticuerpo de 150 kDa e IdeZ de aproximadamente 35 kDa, 4.2 veces, dando 100 veces 200 ng/ml que se dividen con 4.2 que da aproximadamente 5 µg/ml de los polipéptidos probados. El suero estándar que contiene 200 ng/ml de ADA y el IdeS (pCART124) o polipéptidos probados se preincuban juntos durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). Como un control de unión de ADA máximo, la misma concentración de los estándares se preincuba sin IdeS (pCART124) o cualesquier otras proteasas de cisteína IgG y se utiliza como un valor máximo de unión de 80%. El nivel más bajo de la curva estándar se utiliza como valores límites inferiores para el rango del cálculo de la competición. La puntuación promedio para los estándares preincubados con IdeS (pCART124) o los polipéptidos probados se resta con el estándar de 80% dividido con el valor de unión estándar de 80% menos los valores límite inferiores dando un valor de % de competición. Los polipéptidos de proteasa de cisteína IgG con el % de promedio de competición más bajo que la mayoría de epítopos de unión ADA se ha abolido en comparación con IdeS original (pCART124).

Breve resumen del Protocolo de laboratorio: se recubren pozos de placas de multivaloración durante la noche con pCART124 (1 µg/ml), se lava 3 veces con PBS-T y se bloquea durante 1 hora con 0.45% de gelatina de piel de pescado y 2 mM de ácido yodo acético inhibidor de proteasa de cisteína (IHAc) en PBS.

Ambos estándares se preparan como una serie de valoración en etapas de dilución 1:3 en 0.45% de gelatina de piel de pescado e IHAc de 2 mM en PBS, de 5000 ng de ADA (IdeS)/ml a 2,5 ng de ADA (IdeS)/ml para permitir graficar una curva de calibración estándar para el ensayo, con mediciones tanto en la parte lineal como en la parte máxima y mínima de la curva estándar. Al mismo tiempo como un bloqueo de la placa, los estándares y el IdeS (pCART124) o polipéptidos probados se preincuban juntos durante 1 hora a TA, es decir, las muestras en una etapa de competición, utilizando 200 ng/ml de ADA (estándares) y 5 µg/ml de control IdeS (pCART124) o polipéptidos de proteasa de cisteína IgG que se van a probar.

La placa recubierta con pCART124 se lava 3 veces y luego se preincuban 50 µl de muestras o se agregan 50 µl estándar a cada pozo de la placa de multivaloración.

La placa se incuba a TA durante 2 horas y luego se lava con PBS-T. Se agrega biofragmento $F(ab)_2$ específico para F(ab) antihumano de cabra (Jackson #109-066-097, 0.65 mg/ml) (diluido 1000x), como anticuerpo detector y Sulfoestreptavidina (MSD Cat. No.: R32AD-1 o R32AD-5) (diluido 2000x) en regulador de bloqueo incubado durante 1 hora a TA en la oscuridad. La placa se lava 3 veces y se agrega regulador de Lectura T (regulador de lectura MSD T (4x)) 4x y la placa se analiza en un lector de Placa, MSD (Descubrimiento de Meso Escala) QuickPlex SQ 120 Modelo 1300 directamente.

Resultados y discusión

Se muestra el porcentaje (%) de bloqueo de los sitios de unión IdeS-ADA para pCART207, 217, 219 y 226 en la figura 19 y figura 20 y se utiliza el IdeS pCART124 original como control positivo para semejanza del 100%.

Todos los polipéptidos de proteasa de cisteína IgG probados, pCART207, 217, 219 y 226 ocupan menores sitios de unión de ADA en suero humano en comparación con IdeS original (pCART124). Los pacientes que han sido tratados con IdeS una vez (grupo 2 fase II) han desarrollado más ADA específico de IdeS y hubo reconocimiento mínimo de

pCART207, 217 y 219 (figura 20) en comparación con el grupo de suero de voluntarios saludables (grupo de suero humano 1191807) (figura 19).

Ejemplo 6 – evaluación de la eficacia in vivo en un modelo de ratón (IgIV humano) Octagam.

En el presente estudio se inyectaron ratones BALB/c intraperitonealmente (i.p.) con IgIV humano (Octagam). Se administra la concentración IgIV humano en una dosis de 900 mg/kg, para correlacionar con la concentración de plasma de IgG humano (10 mg/ml).

El IgIV humano se inyecta i.p. en el día 0. Veinticuatro horas (1día) después de la inyección de IgIV humano, PBS, controles IdeS (BX1001865 y pCART124), o las proteasas IgG que se van a probar, pCART207, pCART217, pCART219 y pCART226, se administran intravenosamente, (i.v.) en una dosis de 1 mg/kg. Dos horas después se recolectan las muestras y se sacrifican los ratones.

Eficacia ELISA

El principio del ensayo es recubrir pozos de una placa de multivaloración con un fragmento $F(ab')_2$- dirigido a anticuerpos IgG humanos con especificidad para la región Fab. Luego se agrega suero de ratones tratados con IgIV y controles IdeS (BX1001865 y pCART124) o el poli péptido de proteasa IgG de cisteína probado. La cantidad de IgG (IgIV) humano dividido individual o intacto unido a los pozos se mide utilizando un anticuerpo detector dirigido a IgG (IVIg) humano con especificidad contra la parte de Fc del anticuerpo. Entre menor es la concentración detectada de anticuerpo (IVIg) de IgG humano intacto más efectiva se espera que sea el poli péptido de proteasa de cisteína IgG.

Breve resumen del Protocolo de laboratorio: Se recubren durante la noche pozos de placas de multivaloración (+ 2-8 ° C) con fragmento $F(ab)_2$ específicos de Fab anti humano 2 de cabra (0.5 µg/ml) (Jackson #109-006-097), luego se lava con PBS+0.05% Tween 20 (PBS-T) y se bloqueado en BSA al 2% en PBS-T (regulador de bloqueo) durante 45-120 min a TA (temperatura ambiente). Se utiliza el calibrador de proteína (DAKO #X0908) como un estándar y se agrega en un rango de 0,5-300 ng/ml. Las muestras de suero tomadas de ratones tratados con IVIg y diferentes polipéptidos de proteasa de cisteína IgG se descongelan y diluyen en un regulador de bloque 100 000 veces antes de la adición al ensayo de placa de multivaloración. La placa se incuba 2 horas con agitación a RT y luego se lava con PBS-T. Se mezcla anticuerpo específico para Fc IgG anti humano de ratón biotinilado (600 ng/ml) (Jackson #109-066-098) con Strep-sulfo (200 ng/ml) (MSD #R32AD-1) y se agrega a la placa de multivaloración. La placa se sella con cinta de aluminio y se incuba a RT durante 1 hora con agitación. La placa se lava luego en PBS-T y a cada pozo se agrega 150 µL de regulador de lectura T diluido 2X (MSD #R92TC-2). La placa se analiza inmediatamente en un lector de placas, MSD (Descubrimiento de Meso Escala) QuickPlex SQ 120 Modelo 1300 directamente.

Eficacia visualizada en gel

Para visualizar la división IgG humana in vivo en ratones se diluyen 10 µl de suero 1:10 en 90 µl de PBS. Después se mezclan 10 µl diluido en suero con 30 µL de SDS-PAGE4 X de regulador de carga. Se agrega 5 µl de marcador interno IgG para mostrar los diferentes fragmentos IgG (IgG, scIgG y $F(ab')_2$). Las muestras se calientan a 92° C por 3 min (Termo Mezclador Compacto, Eppendorf) y se centrifugó brevemente antes de cargar 10 µL en Mini-Protean® TGX al 4-20% gel Stain Free ™ (CAT. #456-8096, Biorad). Los geles se someten a 200 V durante 40 min.

Resultados y conclusión

La división in vivo del IgIV humano (Octagam) por IdeS (BX1001865 y pCART124) y pCART207, 217, 219 y 226 se comparan al estudiar el nivel de IgG humano en suero mediante eficacia ELISA y el analizar la degradación de IgG mediante SDS-PAGE.

Tratamiento con IdeS (BX1001865 y pCART 124) y las diferentes proteasas de cisteína IgG pCART207, pCART217, pCART219 y pCART226 en ratones IVIg demuestra claramente la división del IgG humano in vivo en este modelo de ratón (tabla 7 y figura 21).

Se muestra la división completa para el control IdeS (BX1001865), pCART207 y pCART217, sin bandas scIgG visibles y bandas $F(ab')_2$ significativas en los geles (Figura 22). pCART219 y pCART226 mostraron una menor eficacia en este modelo de ratón con moléculas scIgG aun presentes en el suero del ratón después de dos horas (Figura 22). Sin embargo, no se puede detectar IgIV intacto en el gel indicando que la mayor concentración de IgG- Fc por el anticuerpo detector (barra más grande para pCART219 y pCART226 en la figura 21 viene de scIgG y no IgG intacto. Ratón no: 2 en el grupo de pCART207 y el ratón no: 4 en el grupo de pCART219 no recibieron la inyección IgIV (figura 22B y C), por lo tanto no fueron visibles los fragmentos de división IgG en el gel de estos animales. Los patrones de banda de proteína representarán las proteínas de fondo en el suero de ratón BALB/c. Esto muestra que los polipéptidos de la invención dividen IgG en un modelo en vivo.

Tabla 7. Análisis de división In vivo de IgG humano en suero de ratones tratados con IdeS (BX1001865 y pCART124/proteasas de cisteína IgG probadas mediante ELISA de eficacia (promedio ± Desviación Estándar).

	Promedio (mg/mL)	Desviación Estándar
Control (PBS)	6.58	0.80
BX1001865	0.30	0.05
pCART124	0.39	0.12
pCART207	0.66	0.03
pCART217	0.78	0.05
pCART219	0.99	0.18
pCART226	1.80	0.85