

CISTEÍNA PROTEASA

DESCRIPCIÓN

5 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.

10

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 (sclgG) con una molécula de Fc unida no covalentemente. La molécula sclgG 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 divide 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.

25

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.

30

35

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 excluir 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, excluyendo por lo tanto la administración adicional de IdeS.

40

45

50

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 de 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.

60

65

Los presentes inventores han adoptado un método completamente diferente. Los inventores han identificado posiciones específicas dentro de la secuencia de IdeS que, cuando se modifican como se describe aquí, conduce a polipéptidos novedosos para los que los problemas asociados con inmunogenicidad se reducen en comparación con IdeS. Algunas modificaciones pueden aumentar la eficacia en la división del IgG del polipéptido de la invención con relación al IdeS, reduciendo por lo tanto indirectamente la inmunogenicidad al permitir el uso de una menor dosis o concentración para alcanzar el mismo efecto. Alternativamente, o adicionalmente, otras modificaciones pueden reducir directamente la inmunogenicidad al reducir la capacidad de los anticuerpos IdeS específicos para reconocer el polipéptido de la invención con relación al IdeS.

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 SEQ ID NO: 2.

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: 1, partiendo del terminal N. De esta manera, en razón a que la SEQ ID NO: 2 carece de la metionina terminal N y la secuencia de señal de 28 aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, el residuo de ácido aspártico (D) en el terminal N de la SEQ ID NO: 2 se refiere en cuanto a la posición 30 ya que esta es la posición correspondiente en la SEQ ID NO: 1. 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 94 (residuo 65 del terminal N de la SEQ ID NO: 2). Probablemente otros residuos sean importantes para la actividad de proteasa de cisteína IgG son lisina (K) en la posición 84, histidina (H) en la posición 262 y ácido aspártico (D) en cada una de las posiciones 284 y 286. Estos son residuos 55, 233, 255 y 257 del terminal N de la SEQ ID NO: 2, 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: 2, cuya variante:

- (a) es por lo menos 50% idéntica a la SEQ ID NO: 2;
- (b) tiene una cisteína (C) en la posición en dicha secuencia variante que corresponde a la posición 94 de la SEQ ID NO: 1; y, opcionalmente,
- (c) tiene, en las posiciones en dicha secuencia variante que corresponden a las posiciones 84, 262, 284 y 286 de la SEQ ID NO: 1, 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 IgG que IdeS y/o es menos inmunogénico que el IdeS. El polipéptido de la invención puede ser más efectivo en dividir IgG1 que IgG2.

Preferiblemente, dicha variante de la SEQ ID NO: 2:

- (1) tiene un aminoácido cargado positivamente en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 130 de la SEQ ID NO: 1, 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 131 de la SEQ ID NO: 1, opcionalmente en el que dicho aminoácido cargado positivamente es arginina (R) o lisina (K); y/o
- (3) no incluye la secuencia NQTN contigua; y/o
- (4) no incluye la secuencia contigua DSFSANQEIR YSEVTPYHVT.

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 agente terapéutico al sujeto; en el que:

- 5 • 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;
- 10 • la cantidad de dicho polipéptido administrado es suficiente para dividir substancialmente todas las moléculas IgG presentes en el plasma del sujeto; y
- 15 • 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.
- 15 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.

20 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra 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.

- 25 La figura 2 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 3 muestra los resultados de un gel SDS-PAGE representativo utilizado para visualizar los productos de división producidos mediante incubación de IgG1 con polipéptidos adicionales de la invención o controles.

- 30 La figura 4 muestra los resultados de un gel SDS-PAGE representativo utilizado para visualizar los productos de división producidos por incubación de IgG2 con polipéptidos de la invención o controles.

- 35 Las figuras 5 y 6 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.

La figura 7 muestra curvas de valoración representativas para división de IgG1 mediante diferentes polipéptidos de proteasa de cisteína IgG.

- 40 La figura 8 muestra curvas de valoración representativas para división de IgG2 mediante diferentes polipéptidos de proteasa de cisteína IgG.

- 45 La figura 9 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 10 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.

- 50 La figura 11 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 12 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.

- 55 La figura 13 es una representación esquemática de la división de inmunoglobulinas mediante polipéptidos de la invención.

La figura 14 muestra el resultado de un % representativo de competición de sitios de unión ADA con polipéptidos de la invención o controles.

- 60 La figura 15 muestra los resultados de un % representativo adicional de competición de sitios de unión ADA con polipéptidos de la invención o controles.

- 65 La figura 16 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 17 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

La SEQ ID NO: 3 a 16 son las secuencias de polipéptidos de ejemplo de la invención

La SEQ ID NO: 17 es la secuencia en el polipéptido IdeS utilizado aquí como un control. Comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 con una metionina de terminal adicional N y una EAG histidina (referencia interna pCART124).

La SEQ ID NO: 18 es la secuencia contigua NQTN, que corresponde a las posiciones 336 - 339 de la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 19 es la secuencia contigua DSFSANQEIR YSEVTPYHVT, que corresponde a las posiciones 30-49 de la SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 20 a 34 son secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos divulgado aquí.

SEQ ID NO: 35 es la secuencia SFSANQEIRY SEVTPYHVT, que corresponde a las posiciones 31-49 de la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 36 es la secuencia DYQRNATEAY AKEVPHQIT, que corresponde a las posiciones 36 - 54 del polipéptido IdeZ No. de secuencia de referencia NCBI WP_014622780.1.

SEC ID NO. 37 es la secuencia DDYQRNATEA YAKEVPHQIT, que puede estar presente en el terminal N de un polipéptido de la invención.

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 intercambiabilmente 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 del polipéptido

La presente invención se refiere a un polipéptido nuevo que tiene actividad de proteasa de cisteína IgG, en el que dicho polipéptido es más efectivo en dividir IgG que IdeS y/o es menos inmunogénico que IdeS. En el contexto de un control o una comparación con relación a un polipéptido de la invención, “IdeS” se refiere a un polipéptido que consiste de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Alternativamente o adicionalmente, “IdeS” cuando se utiliza como un control o una comparación se puede referir a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la secuencia de la SEQ ID NO: 2 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 SEQ ID NO: 14. 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 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 los 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 normalmente 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 o 7.5 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 4.5 veces, más preferiblemente por lo menos 6.0 veces y más preferiblemente por lo menos 7.5 veces mayor que la potencia del IdeS medido en el mismo ensayo. El aumento de potencia con relación al IdeS es una mejora deseable independiente de los problemas asociados con la inmunogenicidad de IdeS. Sin embargo, dicho aumento de potencia normalmente también permitirá el uso de una menor dosis de un polipéptido de la invención del 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. Un polipéptido de la invención puede por lo tanto ser tan inmunogénico como el IdeS o incluso más inmunogénico que el IdeS cuando está presente a una dosis equivalente, pero los problemas asociados con esta inmunogenicidad se reducen o evitan debido a que se requiere una menor dosis para alcanzar el mismo efecto terapéutico. En una realización alternativa, un polipéptido de la invención puede tener una potencia equivalente al IdeS siempre que sea menos inmunogénico que el IdeS cuando esté presente en una dosis equivalente.

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 agregan luego a los pozos, seguido por muestras de anticuerpos específico objetivo que es 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. El polipéptido de la invención puede ser más efectivo en dividir IgG1 que IgG2.

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 IdeS 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 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. 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 puede ser tan inmunogénico como el IdeS o incluso más inmunogénico que el IdeS cuando está presente en una dosis equivalente, debido a que los problemas asociados con esta inmunogenicidad se reducen o se evitan, debido a que se requiere una menor dosis del polipéptido de la invención para alcanzar el mismo efecto terapéutico. Sin embargo, normalmente un polipéptido de la invención no es más inmunogénico que el IdeS y preferiblemente es menos inmunogénico que el 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 90%, no mayor del 85%, no mayor del 80%, no mayor del 70%, no mayor del 60%, o no mayor del 50% de la inmunogenicidad del IdeS medido en el mismo ensayo. Preferiblemente, la inmunogenicidad de un polipéptido de la invención no es mayor del 85% de la inmunogenicidad del IdeS medido en el mismo ensayo. Más preferiblemente, la inmunogenicidad de un polipéptido de la invención no es mayor del 70% 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 yodo acético (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.

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. 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 IdeS, 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 yodo acético (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 IdeS. 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 aminoácidos de longitud. El polipéptido de la invención normalmente no es mayor de 400, 350, 340, 330, 320 o 310 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 310 aminoácidos de longitud.

La estructura primaria (secuencia de aminoácidos) de un polipéptido de la invención se basa en la estructura primaria de IdeS, específicamente la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. La secuencia de un polipéptido de la invención comprende una variante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, que es por lo menos el 50% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. 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% idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 2. La variante puede ser idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 2 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: 2 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 SEQ ID NO: 2 o más preferiblemente sobre la longitud completa del SEQ ID NO: 2.

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 (tal 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 identificar 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: 2 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: 2. A menos que se especifique otra cosa, las modificaciones son preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservadoras. Las sustituciones 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 hidrofiliidad, 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 cambios 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

5	Ile	4.5
	Val	4.2
10	Leu	3.8
	Phe	2.8
	Cys	2.5
15	Met	1.9
	Ala	1.8
20	Gly	-0.4
	Thr	-0.7
	Ser	-0.8
25	Trp	-0.9
	Tyr	-1.3
30	Pro	-1.6
	His	-3.2
	Glu	-3.5
35	Gln	-3.5
	Asp	-3.5
40	Asn	-3.5
	Lys	-3.9
45	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: 2. Sin embargo, ciertos residuos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 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 94 de la SEQ ID NO: 1 se deben retener (residuo 65 de la SEQ ID NO: 2) en la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la invención. Opcionalmente, la lisina en la posición 84, la histidina en la posición 262 y el ácido aspártico en cada una de las posiciones 284 y 286 de la SEQ ID NO: 1 también se retienen. Existen los residuos 58, 238, 260 y 262 del terminal N de la SEQ ID NO: 4 y los 55, 233, 255 y 257 de la SEQ ID NO: 2, 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 94 de la SEQ ID NO: 1; y opcionalmente tiene en las posiciones en dicha secuencia variante corresponde a las posiciones 84, 262, 284 y 286 de la SEQ ID NO: 1, 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 lo siguiente:

- (1) Reemplazar la asparagina (N) en la posición 130 de la SEQ ID NO: 1 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: 2 que tiene un aminoácido cargado positivamente en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 130 de la SEQ ID NO: 1. 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 "N130R/K".
- (2) Reemplazar la glicina (G) en la posición 131 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: 2 que tiene un aminoácido cargado positivamente en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 131 de la SEQ ID NO: 1. Los aminoácidos cargados positivamente comunes 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 "G131R/K".
- (3) Eliminar los últimos cuatro residuos en el terminal C de la SEQ ID NO: 2 mejora la potencia de un polipéptido que incorpora este cambio. Por lo menos los cuatro residuos en el terminal C de la SEQ ID NO: 2 consisten de la secuencia contigua NQTN. Sin embargo, un polipéptido de la invención puede comprender una variante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 que no incluye la secuencia contigua NQTN. Es decir, los últimos cuatro residuos en el terminal C de la SEQ ID NO: 2 pueden estar ausentes de dicha variante de la SEQ ID NO: 2. Los últimos cuatro residuos de la SEQ ID NO: 2 corresponden a las posiciones 336-339 de la SEQ ID NO: 1. De acuerdo con lo anterior, esta modificación particular se puede aquí mediante el término "N336_N339del".
- (4) Eliminar o alterar la secuencia de los primeros veinte residuos en el terminal N de la SEQ ID NO: 2 puede mejorar la potencia de un polipéptido que incorpora este cambio y/o puede reducir la inmunogenicidad sin afectar adversamente la potencia.
- Los primeros veinte residuos en el terminal N de la SEQ ID NO: 2 consisten de la secuencia contigua DSFSANQEIRYSEVTPYHVT (SEQ ID NO: 19). De esta manera, un polipéptido de la invención puede comprender una variante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 que no incluye la secuencia contigua DSFSANQEIRYSEVTPYHVT.
- Como un ejemplo, dicha secuencia contigua de la SEQ ID NO: 19 se puede eliminar en su totalidad. Es decir, los primeros veinte residuos en el terminal N de la SEQ ID NO: 2 pueden estar ausentes de dicha variante de la SEQ ID NO: 2. Los primeros veinte residuos de la SEQ ID NO: 2 corresponden a las posiciones 30-49 de la SEQ ID NO: 1. De acuerdo con lo anterior, la eliminación de esta secuencia contigua se puede identificarse aquí mediante el término "D30_T49del".
- Alternativamente, un polipéptido de la invención puede comprender una variante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en la que la secuencia de los primeros veinte residuos en el terminal N de la SEQ ID NO: 2 se altera al reemplazar uno o más aminoácidos en dichos primeros veinte residuos. La secuencia alterada tiene preferiblemente inmunogenicidad reducida en comparación con los primeros veinte aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. Como un ejemplo, los aminoácidos en las posiciones 2 a 20 de la SEQ ID NO: 2 (que corresponde a las posiciones 31-49 de la SEQ ID NO: 1) se pueden reemplazar opcionalmente con la secuencia contigua DYQRNATEAY AKEVPHQIT (SEQ ID NO: 36). En otras palabras, los primeros veinte aminoácidos de un polipéptido de la invención pueden consistir de la secuencia DDYQRNATEA YAKEVPHQIT (SEQ ID NO: 37) en lugar de la secuencia de la SEQ ID NO: 19. La secuencia insertada SEQ ID NO: 36 se toma de la región terminal N de IdeZ y corresponde a las posiciones 36-54 del IdeZ de la secuencia de referencia NCBI No. WP_014622780.1. Los sujetos humanos normalmente no expresan anticuerpos para IdeZ, y de esta manera un polipéptido que incluye esta secuencia es menos propenso a ADA. El reemplazo de la SEQ ID NO: 35 con la SEQ ID NO: 37 se puede identificar aquí mediante el término "S31_T49replZ".
- En resumen, por lo tanto, un polipéptido de la invención comprende una variante de la secuencia de la SEQ ID NO: 2, cuya variante:
- (a) es por lo menos 50% idéntica a SEQ ID NO: 2;
- (b) tiene una cisteína (C) en la posición en dicha secuencia variante que corresponde a la posición 94 de la SEQ ID NO: 1; y, opcionalmente,
- (c) tiene, en las posiciones en dicha secuencia variante que corresponden a posiciones 84, 262, 284 y 286 de la SEQ ID NO: 1, una lisina (K), una histidina (H), un ácido aspártico (D) y un ácido aspártico (D), respectivamente.
- Preferiblemente, dicha variante de la SEQ ID NO: 2:
- (1) tiene un aminoácido cargado positivamente en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 130 de la SEQ ID NO: 1, 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 131 de la SEQ ID NO: 1, opcionalmente en el que dicho aminoácido cargado positivamente es arginina (R) o lisina (K); y/o

5 (3) no incluye la secuencia contigua NQTN; y/o

(4) no incluye la secuencia contigua DSFSANQEIR YSEVTPYHVT.

10 Dicha variante de la SEQ ID NO: 2 puede incluir una, dos, tres o todas las cuatro de las modificaciones (1) a (4) establecidas anteriormente. Dicha variante puede incluir cualquier combinación de dos o tres modificaciones (1) a (4) establecidas anteriormente. Una variante preferida incluye la modificación (3) y por lo menos una de las modificaciones (1) y (2). Otra variante preferida incluye las modificaciones (3) y (4) y por lo menos una de las modificaciones (1) y (2).

15 Los inventores también han determinado que ciertas otras modificaciones a la secuencia de la SEQ ID NO: 2, que se pueden aplicar alternativamente o adicionalmente a cualquier combinación de las modificaciones (1) a (4) descritas anteriormente, pueden aumentar la potencia de un polipéptido de la invención y/o pueden reducir el reconocimiento de un polipéptido de la invención mediante ADA específico para IdeS. De esta manera, un polipéptido de la invención puede comprender una variante de la secuencia de la SEQ ID NO: 2 en la que se hace una sustitución en una o más de las posiciones que corresponden a las posiciones 115, 119, 139, 142, 198, 216, 226, 241, 245, 302, 316 y 333 de la SEQ ID NO: 1. Dicha variante puede comprender una sustitución en todas estas posiciones, pero normalmente comprende una sustitución en dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete de estas posiciones. Las sustituciones en estas posiciones normalmente reemplazan al aminoácido existente con otro aminoácido que tiene diferentes propiedades. Por ejemplo, un aminoácido no cargado se puede reemplazar con un aminoácido cargado, y viceversa. Las sustituciones preferidas en estas posiciones se establecen en la tabla B adelante utilizando el código de una letra:

25

Tabla B

Aminoácido existente en la SEQ ID NO: 2	Posición en la SEQ ID NO: 1	Reemplazo preferido
K	115	E
E	119	R
E	139	K
D	142	R
E	198	K
D	216	N
D	226	N
K	241	E
E	245	K
S	302	K
D	316	K
D	333	K

30 Cada una de las sustituciones en la tabla B se puede denominar aquí utilizando un término obtenido al combinar las entradas en la primera, segunda y tercera columnas para cada fila de derecha de izquierda. Por ejemplo, la sustitución en la primera fila se puede denominar aquí como "K115E", la sustitución en la segunda fila se puede denominar aquí "E119R", etcétera. La modificación específica "D226N" pretende interrumpir un motivo de adhesión celular en la secuencia de la IdeS, es decir, la secuencia RGD contigua en las posiciones 224-226 de la SEQ ID NO: 1.

35 La Tabla C adelante resume las modificaciones hechas para producir las secuencias de aminoácidos de determinados polipéptidos de ejemplo de la invención.

Tabla C

Referencia interna	Modificaciones con relación a IdeS (las posiciones corresponden a SEQ ID NO: 1)	SEQ ID NO de secuencia completa
pCART152	N130R	3
pCART183	N130K, E198R, D216N	4
pCART184	N130R, E198K, D216N, S302K	5
pCART185	E119R, D216N, T244D	6
pCART186	E119K, D142R, D216N, T244E, S302K	7
pCART187	K115E, D216N, K241E, E245K, D316K, D333K	8
pCART188	E119K, N130R, D142R, D216N, K241S, T244E, E245N, S302K	9

pCART189	E119K, N130R, D142R, E198K, D216N, T244E	10
pCART190	K115E, N130R, E198K, D216N, K241E, E245K, D333K	11
pCART209	N336_N339del (eliminación NQTN)	12
pCART125	D30_T49del (eliminación DSFSANQEIR YSEVTPYHVT)	13
pCART213	D30_T49del (eliminación DSFSANQEIR YSEVTPYHVT), N130K, D216N	14
pCART214	D30_T49del (eliminación DSFSANQEIR YSEVTPYHVT), K115E, N130K, E139K, D216N, K241E, E245K, D333K	15
pCART228	S31_T49replZ (reemplaza SEQ ID NO: 35 con SEQ ID NO: 36), K115E, N130K, E139K, D216N, K241E, E245K, D333K	16

La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y 2 se reproduce completamente adelante, seguido por la secuencia de aminoácidos de cada uno de los polipéptidos de ejemplo de la invención descritos en la tabla C.

SEQ ID NO:1

5

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFANQEIRYSEVTPYHVTSSWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGW
YDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYFKEK
AFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKK
ELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDNSGNLKAIVTSDSDSNASIGMKKYFVG
NSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

10

SEQ ID NO: 2

15

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSSWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTFNGKDDLLCGAATA
GNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHL
GVFPDHDVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLI
KKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDNSGNLKAIVTSDSDSNASIGMKKYFVG
VNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

20

SEQ ID NO: 3 (pCART152)

25

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSSWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWF
DQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSL
TNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGA
DFDSNGNLKAIVTSDSDSNASIGMKKYFVG
VNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 4 (pCART183)

30

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSSWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWF
DQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSL
TNHGPTPVKRGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGA
DFDSNGNLKAIVTSDSDSNASIGMKKYFVG
VNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 5 (pCART184)

35

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSSWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWF
DQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSL
TNHGPTPVKKGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGA
DFDSNGNLKAIVTSDSDSNASIGMKKYFVG
VKNAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

40

SEQ ID NO: 6 (pCART185)

45

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSSWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWF
DQNKDQIKRYLREHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSL
TNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKEEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGA
DFDSNGNLKAIVTSDSDSNASIGMKKYFVG
VNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 7 (pCART186)

50

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSSWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWF
DQNKDQIKRYLKEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIRTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSL
TNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKEEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGA
DFDSNGNLKAIVTSDSDSNASIGMKKYFVG
VKNAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 8 (pCART187)

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSSWTKGVTTPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWF
DQNKDQIERYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSL
TNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKEELTKGKALGLSHTYANVRINHVINLWGA
DFDSNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEKNIGAQVLGLFTLSTGQKSWNQTN

SEQ ID NO: 9 (pCART188)

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSSWTKGVTTPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWF
DQNKDQIKRYLKEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSL
TNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKEELTKGKALGLSHTYANVRINHVINLWGA
DFDSNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 10 (pCART189)

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSSWTKGVTTPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWF
DQNKDQIKRYLKEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSL
TNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKEELTKGKALGLSHTYANVRINHVINLWGA
DFDSNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 11 (pCART190)

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSSWTKGVTTPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWF
DQNKDQIERYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSL
TNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKEELTKGKALGLSHTYANVRINHVINLWGA
DFDSNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQKSWNQTN

SEQ ID NO: 12 (pCART209)

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSSWTKGVTTPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWF
DQNKDQIKRYLKEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSL
TNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGA
DFDSNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSW

SEQ ID NO: 13 (pCART125)

SVWTKGVTTPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKI
NFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIF
DAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDSNGLKAIYVTDSDSNAS
IGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 14 (pCART213)

SVWTKGVTTPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKI
NFKGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIF
DAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDSNGLKAIYVTDSDSNAS
IGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 15 (pCART214)

SVWTKGVTTPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIERYLEEHPEKQKI
NFKGEQMFDVKKAIIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIF
DAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKEELTKGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDSNGLKAIYVTDSDSNAS
IGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQKSWNQTN

SEQ ID NO: 16 (pCART228)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTTPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWF
DQNKDQIERYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKKAIIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSL
TNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKEELTKGKALGLSHTYANVRINHVINLWGA
DFDSNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQKSWNQTNNGGGHHHHHH

El polipéptido de la invención puede comprender, consistir esencialmente, o consistir en la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 3 a 16. Cada una de las SEQ ID NO: 3 a 16 puede incluir opcionalmente una metionina adicional en el terminal N y/o un marcador histidina en el terminal C. El marcador histidina consiste preferiblemente en seis residuos histidina. El marcador histidina está ligado preferiblemente al terminal C mediante un ligador de residuos de glicina 3x o

glicina5x. Para la SEQ ID NO: 13 el marcador de histidina está ligado preferiblemente al terminal C mediante un ligador de residuos de glicina 5x.

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: 20 a 34. 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 intercambiabilmente 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 específica allí. También se entiende que los polipéptidos se pueden modificar químicamente, por ejemplo, modificar postraducción. 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 sustancialmente 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, glutatona 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

5 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

10 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.

20 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.

25 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 tener un límite inferior de aproximadamente 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 0.19, 0.20, 0.21, 0.22, 0.23, 0.24, 0.25 mg/kg de peso corporal. La cantidad de dicho polipéptido que se administra puede tener un límite superior de aproximadamente 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0 Mg/kg de 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.

50 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.

60 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	Esteroides 21-hidroxilasa, 17 alfa-Hidroxilasa (17OH) y enzima de división de cadena lateral (P450scc), Tiroperoxidasa, Tiroglobulina y H+/K(+)-
Glomerulonefritis anti-GBM (relacionada con Goodpasture)	Membrana de base antiglomerular (anti-GBM): dominios de nanocolágeno (NCI) 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)
Síndrome 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 dermosómicas)
Anemia hemolítica Autoinmunitaria (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-tienílico, UGT1A, CYP1A2, CYP2A6, CYP3A, CYP2E1, CYP11A1, CYP17 y CYP21
Neutropenia autoinmunitaria (AIN)	FcgRIIIb
Pénfigo buloso (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 Sjögrens (SSA)), La (antígeno B de síndrome de Sjögrens (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 adquirida 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 dermatopatía de infiltración y exoftalmos infiltrativos, hipertiroidismo y Goitre	Receptor de Tirotropina (TSHR) peroxidasa Tiroides (TPO)
Síndrome de Guillain-Barré (GBS). Polineuropatía desmielinizante 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	Receptores acetilcolina (AChR), quinasa específica de músculo (MuSK)

Miastenia crisis	
Miocarditis, cardiomiopatía dilatada (DCM) (cardiomiopatía congestiva)	Autoanticuerpos de reacción del corazón contra múltiples antígenos, por ejemplo Miosina cardíaca
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 cardíaca reumática (RHD), (Fiebre reumática)	Miosina cardíaca
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), anhidrasa 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 P rARN, Clq
Síndrome persona rígida (SPS)	Descarboxilasa de ácido glutámico (GAD), anifisina.
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-fibrilina-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).

- 5 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.

10 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

15 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.

25 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

5 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
10 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),
15 Tumor Carcinoide Gastrointestinal, tumor estromal Gastrointestinal (GIST), tumor de célula germinal: extracraneal, extragonadal, u ovárico, tumor trofoblastico 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
20 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, rabdmiomiosarcoma, 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
45 (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.

50 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 $\alpha 4\beta 7$, 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 0.1 µg/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 1 µg/kg a 10 mg/kg de peso corporal por día o de aproximadamente 10 µg/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), Atorolimomab, Bapineuzumab, Basiliximab, Bavixumab, 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, Ecomeximab, Eculizumab, Edobacomab, Edrecolomab, Efalizumab, Efungumab, Elotuzumab Elsilimomab, Enavatuzumab, Enlimomab pegol, Enokizumab, Enoticumab, Ensituximab, Eritumomab cituxetan, Epratuzumab, Erlizumab, Ertumaxomab, Etaracizumab, Etrolizumab, Evolocumab, Exbivirumab, Fanolesomab, Faralimumab Farletuzumab, Fasinumab, FBTA05, Felvizumab, Fezakinumab, Ficlaturumab, Figitumumab, Flanvotumab, Fontolizumab, Foralumab, Foravirumab, Fresolimomab, Fulranumab, Futuximab, Galiximab, Ganitumab, Gantenerumab, Gavilimumab, Gemtuzumab ozogamicin, Gevokizumab, Girentuximab, Glematuzumab vedotin, Golimumab, Gomiliximab, GS6624, Ibalizumab, Ibritumomab tiuxetan, Icrucumab, Igovomab, Imciromab, Imgatuzumab, Inclacumab, Indatuximab ravtansine, Infliximab, Intetumumab, Inolimomab, Inotuzumab ozogamicin, Iplimumab, Iratumumab, Itolizumab, Ixekizumab, Keliximab, Labetuzumab, Lampalizumab, Lebrikizumab, Lemalesomab, Lerdelimomab, Lexatumumab, Libivirumab, Ligelizumab, Lintuzumab, Lirilumab, Lodelcizumab, Lortotuzumab mertansina, Lucatumumab, Lumiliximab, Mapatumumab, Maslimomab, Mavrilimumab, Matuzumab, Mepolizumab, Metelimomab, Milatuzumab, Minretumomab, Mitumomab, Mogamulizumab, Morolimomab, Motavizumab, Moxetumomab pasudotox, Muromonab-CD3, Nacolumab tafenatox, Namilumab, Naptumomab estafenatox, Narnatumab, Natalizumab, Nebacumab, Necitumumab, Nerelimumab, Nesvacumab, Nimotuzumab, Nivolumab, Nofetumomab merpentan, Obinutuzumab, Ocaratuzumab, Ocrelizumab, Odulimumab, Ofatumumab, Olaratumab, Olokizumab, Omalizumab, Onartuzumab, Oportuzumab monatox, Oregovomab, Orticumab,

Otelixizumab, Oxelumab, Ozanezumab, Ozoralizumab, Pagibaximab, Palivizumab, Panitumumab, Panobacumab, Parsatuzumab, Pascolizumab, Pateclizumab, Patritumab, Pentumomab, 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, Eculizumab, Omalizumab, Canakinumab, Meplizumab, Reslizumab, Tocilizumab, Ustekinumab, Briakinumab, Etanercept, Infliximab, Adalimumab, Certolizumab pegol, Golimumab, Trastuzumab, Gemtuzumab, Ozogamicin, Ibritumomab, Tiuxetan, Tositumomab, 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 está sensibilizado y no puede ocurrir trasplante. Las pruebas de coincidencia cruzada 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 PRA 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 pérdida 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:

- 5 - 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.

10 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 T incluyen Muromonab, Basiliximab, Daclizumab, un anticuerpo de globulina antitímocito (ATG) y una preparación de inmunoglobulina linfocito, globulina antitímocito (ATGAM). También se sabe que el Rituximab mata o inhibe las células B.

25 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

35 La molécula IdeS madura se analiza y se identifican las regiones adecuadas para mutación. En algunos casos se utiliza evaluación in 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 secuencian 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 siembra en placas de agarosa LB que contienen 30 µg/ml de kanamicina. Se recogen colonias individuales y se inician cultivos durante la noche (3 ml de medio LB) a 37°C, 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 antespumante con el cultivo durante la noche y se cultiva hasta OD 0.6-0.8 (37 °C, 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 -20 °C. 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 eluidas 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® TGXTM al 12% (Biorad) SDS-PAGE.

55 La siguiente tabla resume los cambios hechos para cada polipéptido probado con relación al IdeS maduro, que no incluye la metionina de terminal N adicional 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 con relación a IdeS (posiciones que corresponden a la SEQ ID NO: 1)	SEQ ID NO
pCART152	N130R	3
pCART183	N130K, E198R, D216N	4
pCART184	N130R, E198K, D216N, S302K	5

pCART185	E119R, D216N, T244D	6
pCART186	E119K, D142R, D216N, T244E, S302K	7
pCART187	K115E, D216N, K241E, E245K, D316K, D333K	8
pCART188	E119K, N130R, D142R, D216N, K241S, T244E, E245N, S302K	9
pCART189	E119K, N130R, D142R, E198K, D216N, T244E	10
pCART190	K115E, N130R, E198K, D216N, K241E, E245K, D333K	11
pCART209	N336_N339del (eliminación NQTN)	12
pCART125	D30_T49del (eliminación DSFSANQEIR YSEVTPYHVT)	13
pCART213	D30_T49del (eliminación DSFSANQEIR YSEVTPYHVT), N130K, D216N	14
pCART214	D30_T49del (eliminación DSFSANQEIR YSEVTPYHVT), K115E, N130K, E139K, D216N, K241E, E245K, D333K	15
pCART228	S31_T49repZ (reemplaza SEQ ID NO: 35 con SEQ ID NO: 36), K115E, N130K, E139K, D216N, K241E, E245K, D333K	16

Como control, se produce una versión de IdeS utilizando la misma metodología que se describió anteriormente. Esta versión de IdeS comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 más una metionina de terminal N adicional y un marcador his unido al extremo de terminal C mediante un ligador de glicina corto. Esta versión del IdeS se puede denominar aquí como pCART124. La secuencia de la pCART124 se proporciona adelante:

MDSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTFNGKDDLCCGAATAGNMLHWW
FDQNKDQIKRYLEEHPKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLS
LTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGA
DFDSNGLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVGLGLFTLSTGQDSWNQTNNGGGHHHHHHH
(SEQ ID NO: 17)

La IdeS caree del marcador que 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 probados y pCART124 se proporcionan 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 el extremo 5', codones para el LIGADOR glicina y el marcador histidina, pCART124 (IdeS; SEQ ID NO: 20)

ATGGATAGTTTTCTGCTAATCAAGAGATTAGATATTCGGAAGTAACACCTTATCACGTTACTTCCGTTTGGACCAAA
GGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTCACTCAAGGTGAAGATGTTTTACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTAT
GATATTACAAAACATTCAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTGGTG
GTTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAGCAAAAAATAAACTTCAATGGCGA
ACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTAAAACCACCAGCTAGATAGTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAA
AAAGCTTTCCCTTATCTATCTACTAAACACCTAGGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTTCATTAACGGCTACC
GCCTTAGTCTAACTAACACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGTAGTAAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCC
GTATTTACAAGAGGTGATCAAAGTAAGCTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAATCTCAAAGAAATCAGT
GATCTCATTAAAGAGTTAACCAGGAAGGCAAGGCTACGGCCTATCACACACCTACGCTAACGTACGCATCAACCA
TGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGAACCTTAAAGCTATTTATGTAACGACTCTGATAGTAA
TGCATCTATTGGTATGAAGAAATACTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGTAGCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAA
GAAGATAATATAGGTGCTCAAGTACTAGGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGATAGTTGGAATCAGACCAATGG
CGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART152 (SEQ ID NO: 21)

ATGGATAGTTTTCTGCTAATCAAGAGATTAGATATTCGGAAGTAACACCTTATCACGTTACTTCCGTTTGGACCAAA
GGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTCACTCAAGGTGAAGATGTTTTACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTAT
GATATTACAAAACATTCAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTGGTG
GTTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAGCAAAAAATAAACTTCCGTGGCGA
ACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTAAAACCACCAGCTAGATAGTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAA
AAAGCTTTCCCTTATCTATCTACTAAACACCTAGGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTTCATTAACGGCTACC
GCCTTAGTCTAACTAACACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGTAGTAAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCC
GTATTTACAAGAGGTGATCAAAGTAAGCTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAATCTCAAAGAAATCAGT
GATCTCATTAAAGAGTTAACCAGGAAGGCTACGGCCTATCACACACCTACGCTAACGTACGCATCAACCA
TGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGAACCTTAAAGCTATTTATGTAACGACTCTGATAGTAA
TGCATCTATTGGTATGAAGAAATACTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGTAGCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAA

GAAGATAATATAGGTGCTCAAGTACTAGGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGATAGTTGGAATCAGACCAATGG
CGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART183 (SEQ ID NO: 22)

5 ATGGATAGTTTTCTGCTAATCAAGAGATTAGATATTCGGAAGTAACACCTTATCACGTTACTTCCGTTTGGACCAA
GGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAAGATGTTTTTCACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTAT
GATATTACCAAACATTCAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTGGTG
10 GTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAGCAAAAAATAAACTTCAAAGGCGA
ACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTAAAAACCACCAGCTAGATAGTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAA
AAAGCTTTCCCTTATCTATCTACTAAACACCTAGGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTTCATTAACGGCTACC
GCCTTAGTCTAATAACACGGTCCAACGCCAGTAAACGTTGGTAGTAAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTGGACGCC
GTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAAGCTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAATCTCAAAGAAATCAGT
15 GATCTCATTAAGAAAGAGTTAACCGAAGGCAAGGCTCTAGGCCTATCACACACCTACGCTAACGTACGCATCAACCA
TGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACCTTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGATAGTAA
TGCATCTATTGGTATGAAGAAATACTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGTAGCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAA
GAAGATAATATAGGTGCTCAAGTACTAGGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGATAGTTGGAATCAGACCAATGG
CGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

20 pCART184 (SEQ ID NO: 23)

ATGGATAGTTTTCTGCTAATCAAGAGATTAGATATTCGGAAGTAACACCTTATCACGTTACTTCCGTTTGGACCAA
GGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAAGATGTTTTTCACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTAT
25 GATATTACCAAACATTCAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTGGTG
GTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAGCAAAAAATAAACTTCCGTGGCGA
ACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTAAAAACCACCAGCTAGATAGTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAA
AAAGCTTTCCCTTATCTATCTACTAAACACCTAGGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTTCATTAACGGCTACC
GCCTTAGTCTAATAACACGGTCCAACGCCAGTAAAAAAGGTAGTAAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTGGACGCC
GTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAAGCTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAATCTCAAAGAAATCAGT
30 GATCTCATTAAGAAAGAGTTAACCGAAGGCAAGGCTCTAGGCCTATCACACACCTACGCTAACGTACGCATCAACCA
TGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACCTTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGATAGTAA
TGCATCTATTGGTATGAAGAAATACTTTGTTGGTGTTAATAAAGCTGGAAAAGTAGCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAA
GAAGATAATATAGGTGCTCAAGTACTAGGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGATAGTTGGAATCAGACCAATGG
CGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

35 pCART185 (SEQ ID NO: 24)

ATGGATAGTTTTCTGCTAATCAAGAGATTAGATATTCGGAAGTAACACCTTATCACGTTACTTCCGTTTGGACCAA
GGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAAGATGTTTTTCACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTAT
40 GATATTACCAAACATTCAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTGGTG
GTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGCGTGAGCATCCAGAAAAGCAAAAAATAAACTTCAATGGCGA
ACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTAAAAACCACCAGCTAGATAGTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAA
AAAGCTTTCCCTTATCTATCTACTAAACACCTAGGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTTCATTAACGGCTACC
GCCTTAGTCTAATAACACGGTCCAACGCCAGTAAAAAGAAGGTAGTAAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTGGACGCC
45 GTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAAGCTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAATCTCAAAGAAATCAGT
GATCTCATTAAGAAAGAGTTAGATGAAGGCAAGGCTCTAGGCCTATCACACACCTACGCTAACGTACGCATCAACCA
TGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACCTTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGATAGTAA
TGCATCTATTGGTATGAAGAAATACTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGTAGCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAA
GAAGATAATATAGGTGCTCAAGTACTAGGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGATAGTTGGAATCAGACCAATGG
50 CGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART186 (SEQ ID NO: 25)

ATGGATAGTTTTCTGCTAATCAAGAGATTAGATATTCGGAAGTAACACCTTATCACGTTACTTCCGTTTGGACCAA
GGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAAGATGTTTTTCACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTAT
55 GATATTACCAAACATTCAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTGGTG
GTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAGCAAAAAATAAACTTCAATGGCGA
ACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCCGTAATAAAACCACAGCTAGATAGTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAA
AAAGCTTTCCCTTATCTATCTACTAAACACCTAGGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTTCATTAACGGCTACC
60 GCCTTAGTCTAATAACACGGTCCAACGCCAGTAAAAAGAAGGTAGTAAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTGGACGCC
GTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAAGCTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAATCTCAAAGAAATCAGT
GATCTCATTAAGAAAGAGTTAGAAGAAGGCAAGGCTCTAGGCCTATCACACACCTACGCTAACGTACGCATCAACCA
TGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACCTTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGATAGTAA
TGCATCTATTGGTATGAAGAAATACTTTGTTGGTGTTAATAAAGCTGGAAAAGTAGCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAA
65 GAAGATAATATAGGTGCTCAAGTACTAGGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGATAGTTGGAATCAGACCAATGG
CGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART187 (SEQ ID NO: 26)

5 ATGGATAGTTTTCTGCTAATCAAGAGATTAGATATTCGGAAGTAACACCTTATCACGTTACTTCCGTTTGGACCAAA
GGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAAGATGTTTTTCACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTAT
GATATTACCAAAACATTCAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTGGTG
GTTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTGAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAGCAAAAAATAAACTTCAATGGCGA
ACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTAAAAACCACCAGCTAGATAGTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAA
AAAGCTTTCCCTTATCTATCTACTAAACACCTAGGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTTCATTAACGGCTACC
10 GCCTTAGTCTAACTAACACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGTAGTAAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCC
GTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAAGCTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAATCTCAAAGAAATCAGT
GATCTCATTAAGGAAGAGTTAACCAAAGGCAAGGCTCTAGGCCTATCACACACCTACGCTAACGTACGCATCAACCA
TGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACCTTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGATAGTAA
TGCATCTATTGGTATGAAGAAATACTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGTAGCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAA
15 GAAAAAATATAGGTGCTCAAGTACTAGGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAAAAAGTTGGAATCAGACCAATGG
CGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART188 (SEQ ID NO: 27)

20 ATGGATAGTTTTCTGCTAATCAAGAGATTAGATATTCGGAAGTAACACCTTATCACGTTACTTCCGTTTGGACCAAA
GGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAAGATGTTTTTCACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTAT
GATATTACCAAAACATTCAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTGGTG
GTTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAAACGTTATTTGAAAGAGCATCCAGAAAAGCAAAAAATAAACTTCCGTGGCGA
ACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCCGTACTAAAAACCACCAGCTAGATAGTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAA
25 AAAGCTTTCCCTTATCTATCTACTAAACACCTAGGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTTCATTAACGGCTACC
GCCTTAGTCTAACTAACACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGTAGTAAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCC
GTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAAGCTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAATCTCAAAGAAATCAGT
GATCTCATTAAGAGTGAGTTAGAAAACGGCAAGGCTCTAGGCCTATCACACACCTACGCTAACGTACGCATCAACCA
TGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACCTTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGATAGTAA
30 TGCATCTATTGGTATGAAGAAATACTTTGTTGGTGTTAATAAAGCTGGAAAAGTAGCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAA
GAAGATAATATAGGTGCTCAAGTACTAGGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGATAGTTGGAATCAGACCAATGG
CGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART189 (SEQ ID NO: 28)

35 ATGGATAGTTTTCTGCTAATCAAGAGATTAGATATTCGGAAGTAACACCTTATCACGTTACTTCCGTTTGGACCAAA
GGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAAGATGTTTTTCACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTAT
GATATTACCAAAACATTCAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTGGTG
GTTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAAACGTTATTTGAAAGAGCATCCAGAAAAGCAAAAAATAAACTTCCGTGGCGA
40 ACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCCGTACTAAAAACCACCAGCTAGATAGTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAA
AAAGCTTTCCCTTATCTATCTACTAAACACCTAGGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTTCATTAACGGCTACC
GCCTTAGTCTAACTAACACGGTCCAACGCCAGTAAAAAAGGTAGTAAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCC
GTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAAGCTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAATCTCAAAGAAATCAGT
GATCTCATTAAGAAAGAGTTAGAAGAAGGCAAGGCTCTAGGCCTATCACACACCTACGCTAACGTACGCATCAACCA
45 TGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACCTTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGATAGTAA
TGCATCTATTGGTATGAAGAAATACTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGTAGCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAA
GAAGATAATATAGGTGCTCAAGTACTAGGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGATAGTTGGAATCAGACCAATGG
CGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART190 (SEQ ID NO: 29)

50 ATGGATAGTTTTCTGCTAATCAAGAGATTAGATATTCGGAAGTAACACCTTATCACGTTACTTCCGTTTGGACCAAA
GGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAAGATGTTTTTCACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTAT
GATATTACCAAAACATTCAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTGGTG
55 GTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTGAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAGCAAAAAATAAACTTCCGTGGCG
AACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTAAAAACCACCAGCTAGATAGTAAATTATTTGAATATTTTAAAGA
AAAAGCTTTCCCTTATCTATCTACTAAACACCTAGGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTTCATTAACGGCTAC
CGCCTTAGTCTAACTAACACGGTCCAACGCCAGTAAAAAAGGTAGTAAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGC
CGTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAAGCTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAATCTCAAAGAAATCAG
60 TGATCTCATTAAGGAAGAGTTAACCAAAGGCAAGGCTCTAGGCCTATCACACACCTACGCTAACGTACGCATCAACC
ATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACCTTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGATAGTA
ATGCATCTATTGGTATGAAGAAATACTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGTAGCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAA
AGAAGATAATATAGGTGCTCAAGTACTAGGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAAAAAGTTGGAATCAGACCAATG
65 GCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART209 (SEQ ID NO: 30)

ATGGATAGTTTTCTGCTAATCAAGAGATTAGATATTCGGAAGTAACACCTTATCACGTTACTTCCGTTTGGACCAAA
GGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAAGATGTTTTTCACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTAT
GATATTACCAAAACATTCAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTGGTG
5 GTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAGCAAAAAATAAACTTCAATGGCGA
ACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTAAAAACCACCAGCTAGATAGTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAA
AAAGCTTTCCCTTATCTATCTACTAAACACCTAGGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTCAATTAACGGCTACC
GCCTTAGTCTAACTAACCACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGTAGTAAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCC
10 GTATTTACAAGAGGTGATCAAAGTAAGCTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAATCTCAAAGAAATCAGT
GATCTCATTAAGAAAGAGTTAACCGAAGGCAAGGCTCTAGGCCTATCACACACCTACGCTAACGTACGCATCAACCA
TGTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACCTTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGATAGTAA
TGCATCTATTGGTATGAAGAAATACTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGTAGCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAA
GAAGATAATATAGGTGCTCAAGTACTAGGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGATAGTTGGGGTGGCGGCGGTG
GCCATCATCACCATCACCCTAA

15
pCART125 (SEQ ID NO: 31)

ATGTCCGTTTGGACCAAAGGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAAGATGTTTTTCACGCTCCTTATGTT
GCTAACCAAGGATGGTATGATATTACCAAAACATTCAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGG
20 GAATATGCTTCACTGGTGGTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAGCAAAA
AATAAACTTCAATGGCGAACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTAAAAACCACCAGCTAGATAGTAAATT
ATTTGAATATTTTAAAGAAAAAGCTTTCCCTTATCTATCTACTAAACACCTAGGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATA
TGTTCAATTAACGGCTACCGCCTTAGTCTAACTAACCACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGTAGTAAAGATCCCCGA
GGTGGTATTTTTGACGCCGTATTTACAAGAGGTGATCAAAGTAAGCTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAA
25 AATCTCAAAGAAATCAGTGATCTCATTAAGAAAGAGTTAACCGAAGGCAAGGCTCTAGGCCTATCACACACCTACGC
TAACGTACGCATCAACCATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACCTTAAAGCTATTTATGT
AACAGACTCTGATAGTAATGCATCTATTGGTATGAAGAAATACTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGTAGCTAT
TTCTGCTAAAGAAATAAAAAGAAGATAATATAGGTGCTCAAGTACTAGGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGATAG
TTGAATCAGACCAATGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

30
pCART213 (SEQ ID NO: 32)

ATGTCCGTTTGGACCAAAGGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAAGATGTTTTTCACGCTCCTTATGTT
GCTAACCAAGGATGGTATGATATTACCAAAACATTCAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGG
35 GAATATGCTTCACTGGTGGTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAGCAAAA
AATAAACTTCAAAGGCGAACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTAAAAACCACCAGCTAGATAGTAAATT
ATTTGAATATTTTAAAGAAAAAGCTTTCCCTTATCTATCTACTAAACACCTAGGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATA
TGTTCAATTAACGGCTACCGCCTTAGTCTAACTAACCACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGTAGTAAAGATCCCCGA
GGTGGTATTTTTGACGCCGTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAAGCTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAA
40 AATCTCAAAGAAATCAGTGATCTCATTAAGAAAGAGTTAACCGAAGGCAAGGCTCTAGGCCTATCACACACCTACGC
TAACGTACGCATCAACCATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACCTTAAAGCTATTTATGT
AACAGACTCTGATAGTAATGCATCTATTGGTATGAAGAAATACTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGTAGCTAT
TTCTGCTAAAGAAATAAAAAGAAGATAATATAGGTGCTCAAGTACTAGGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGATAG
TTGAATCAGACCAATGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

45
pCART214 (SEQ ID NO: 33)

ATGTCCGTTTGGACCAAAGGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAAGATGTTTTTCACGCTCCTTATGTT
GCTAACCAAGGATGGTATGATATTACCAAAACATTCAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGG
50 GAATATGCTTCACTGGTGGTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAGCAAAA
AATAAACTTCAAAGGCGAACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTAAAAACCACCAGCTAGATAGTAAAT
TATTTGAATATTTTAAAGAAAAAGCTTTCCCTTATCTATCTACTAAACACCTAGGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGAT
ATGTTCAATTAACGGCTACCGCCTTAGTCTAACTAACCACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGTAGTAAAGATCCCCG
AGGTGGTATTTTTGACGCCGTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAAGCTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAA
55 AATCTCAAAGAAATCAGTGATCTCATTAAGGAAGAGTTAACCAAAGGCAAGGCTCTAGGCCTATCACACACCTACG
CTAACGTACGCATCAACCATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACCTTAAAGCTATTTATG
TAACAGACTCTGATAGTAATGCATCTATTGGTATGAAGAAATACTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGTAGCTA
TTCTGCTAAAGAAATAAAAAGAAGATAATATAGGTGCTCAAGTACTAGGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAAAAA
GTTGAATCAGACCAATGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

60
pCART228 (SEQ ID NO: 34)

ATGGACGATTACCAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAGATCACTTCCGTTTGGACCAA
AGGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAAGATGTTTTTCACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTA
65 TGATATTACCAAAACATTCAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTGGT
GGTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAGCAAAAAATAAACTTCAAAGGC

GAACAGATGTTTGACGTAAAAAAGCTATCGACACTAAAAACCACCAGCTAGATAGTAAATTATTTGAATATTTTAAAG
 AAAAAGCTTTCCCTTATCTATCTACTAAACACCTAGGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTTCATTAACGGCTA
 CCGCCTTAGTCTAATAACCACGGTCCAACGCCAGTAAAGAAGGTAGTAAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACG
 CCGTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAAGCTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAATCTCAAAGAAATCA
 5 GTGATCTCATTAAGGAAGAGTTAACCAAAGGCAAGGCTCTAGGCCTATCACACACCTACGCTAACGTACGCATCAAC
 CATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACCTTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGATAGT
 AATGCATCTATTGGTATGAAGAAATACTTTGTTGGTGTTAATTCGCTGGAAAAGTAGCTATTTCTGCTAAAGAAATAA
 AAGAAGATAATATAGGTGCTCAAGTACTAGGGTTATTTACACTTTCACAGGGCAAAAAAGTTGGAATCAGACCAATG
 10 GCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

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 representación 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 H2SO4 0.5 M de absorbancia (OD) medida en $\lambda = 450$ 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 pCART152, 183, 184, 185, 186, 187, 189 y 190 se muestran en la figura 1, junto con el resultado para pCART124. Todos los polipéptidos de ejemplo de la invención mostrados aquí alcanzan por lo menos 1.5 veces de mejora en potencia con relación al control IdeS (pCART124). PCART152, 183, 184, 188, 189 y 190, todos alcanzan mucha más potencia, incluso tan alta como una mejora de 8.0 veces sobre el control para pCART189. Cada uno de estos seis polipéptidos de texto incluyen la modificación N130R/K. El polipéptido pCART125 se probó por separado y alcanzó una potencia comparable con aquella del IdeS (datos no mostrados).

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

La figura 2 muestra patrones de división producidos con sustrato IgG1 (adalimumab) para pCART183, 184, 185, 186, 187, 189 y 190 como se compara con IdeS (pCART124). Las concentraciones de polipéptidos son de 3.33 µg/ml (línea 1) hacia abajo hasta 0.02 µg/ml (línea 12) en una serie de dilución de etapas 1: 3. Se visualiza el adalimumab intacto (sin enzimas) hacia la izquierda (línea C).

Las flechas a la derecha indican los diferentes productos de división de IgG. Flecha 1: IgG intacto; flecha 2: scIgG (IgG sencillo dividido – 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).

El PCART183, 184, 188, 189 y 190 en particular todos muestran aumento de eficacia de división de la 2ª cadena pesada que resulta en una banda F (ab')₂ más intenso (flecha 3) y banda scIgG menos intensa (flecha 2), en comparación con pCART124 en las mismas concentraciones. La diferencia se observa de la concentración de 0.12 µg/ml (línea 4), pero incluso es más evidente en 0.37 µg/ml (línea 3). De esta manera, la figura 2 general muestra que un cambio a un aminoácido positivo en la posición 130 (N130R/K) aumenta la eficacia de división de la segunda cadena pesada de IgG (pCART183, 184, 188, 189 y 190).

La figura 3 muestra los patrones de división producidos con el sustrato IgG1 para pCART152 y pCART209, como se compara con los controles IdeS (pCART124 y BX1001865). Las concentraciones de enzima son de 3.33 µg/ml (línea 1) hacia abajo hasta 0.02 ng/ml (línea 12) en una serie de dilución en etapas 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 del primer IgG de cadena pesada); Flecha 3: fragmento F(ab')₂ (resulta de la división de la segunda cadena pesada IgG); Flecha 4: fragmento Fc; (*) Indica la proteína portadora (BSA) en el regulador de valoración. Se agregan líneas verticales para facilitar la comparación en la 1ª división de cadena pesada IgG, en el que el IgG intacto se vuelve scIgG (entre las líneas 6 y 7) y en la 2ª división de cadena pesada IgG, en donde el scIgG se vuelve el fragmento F (ab') (entre línea 2 y 3).

El PCART152 y pCART209 ambos muestran aumento de eficacia de división de la segunda cadena pesada que resulta en bandas F(ab')₂ más intensa (flecha 3) y menos scIgG restante (flecha 2), comparado con pCART124 y BX1001865 (flecha 3 y 2) en la misma concentración. Esta diferencia se observa de concentraciones de enzima de 41 ng/ml (línea 5), pero incluso es más evidente en 0.12 µg/ml y 0.37 µg/ml (líneas 4 y 3). Tanto el pCART152 como pCART209 muestran eficacia de división de la segunda cadena pesada aproximadamente IdeS original 3x (BX1001865 y pCART124), es decir, 0.37 µg/ml de pCART152 y pCART209 (línea 3) produce resultados similares a 1.11 µg/ml de BX100186 y pCART124 (línea 2).

PCART152 y pCART209 también muestran una eficacia mejorada en la división de la primera cadena pesada IgG, que resulta de una banda scIgG más intensa (flecha 2) y una banda IgG menos intensa (flecha 1) comparado con el IdeS original (BX1001865 y pCART124) en la misma concentración. Para pCART152 esto se puede observar en 1.5 ng/ml de enzima (línea 8) pero incluso es más obvio en 4.6 ng/ml (línea 7). PCART209 muestra un aumento eficacia de división de aproximadamente IdeS original 3x (BX1001865 y pCART124) también para la primera división de cadena pesada, es decir, 4.6 ng/ml (línea 7) de pCART209 produce resultados similares a 14 ng/ml (línea 6) de BX1001865 y pCART124.

De esta manera, la figura 3 muestra que una única sustitución de aminoácidos en la posición 130 (N130K en pCART152) aumenta la eficacia de división de principalmente el segundo pero también en algún grado la primera cadena pesada

IgG1, y que una eliminación de la secuencia NQTN (pCART209) mejora la eficacia de división en 3 veces tanto para la primera como segunda cadenas pesadas IgG1.

La figura 4 muestra los patrones de división producidos con el sustrato IgG2 para pCART152 y pCART209, según se compara con los controles IdeS (pCART124 y BX1001865). Las concentraciones de enzimas son de 3.33 µg/ml (línea 1) hacia abajo hasta 0.02 ng/ml (línea 12) en una serie de dilución de etapas 1:3. Las flechas a la derecha indican los diferentes productos de división de IgG. Flecha 1: IgG intacto; Flecha 2: scIgG (único IgG dividido - resulta de la división de la primera cadena pesada IgG); Flecha 3: fragmento F (ab')₂ (resultados de la división de la segunda cadena pesada IgG); Flecha 4: fragmento Fc; (*) Indica la proteína portadora (BSA) en el regulador de valoración. Se agregan líneas verticales para facilitar la comparación en la primera división de cadena pesada IgG, en donde el IgG Intacto se vuelve scIgG (entre las líneas 6 y 7) y en la segunda división de cadena pesada IgG, en el que el scIgG se vuelve el fragmento F (ab')₂ (entre líneas 2 y 3).

pCART152 y pCART209 muestran aumento de eficacia de división de la segunda cadena pesada que resulta bandas F (ab')₂ más intensas (flecha 3) y scIgG menos intenso (flecha 2) en comparación con pCART124 y BX1001865 (flecha 3 y 2) en las mismas concentraciones. Esta diferencia se observa de las concentraciones de enzima de 0.37 µg/ml (línea 3), pero aún más evidente en 1.11 µg/ml (línea 2).

El resultado en la línea 6 (concentración de enzimas de 14 ng/ml) para pCART209 según se compara BX1001865 y pCART124 muestra que el pCART209 también es más efectivo en dividir la primera cadena pesada IgG. Esto resulta en una banda IgG intacta menos intensa (flecha 1) y una banda scIgG más intensa (flecha 2), ya que la mayor parte de la proteína se ha convertido a scIgG.

De esta manera, la figura 4 muestra que una única sustitución de aminoácidos en la posición 130 (N130K en pCART152) aumenta la eficacia de la división de principalmente la segunda cadena pesada IgG2, y que una eliminación de la secuencia NQTN (pCART209) mejora la eficacia de división tanto de la primera como según cadenas IgG2 pesadas.

En general, se puede observar que los polipéptidos de prueba son en general más efectivos que el IdeS en dividir el IgG1 e IgG2. Consistente con los resultados ELISA, pCART152, 183, 184, 188, 189 y 190 parecen ser particularmente efectivos. El aumento de eficacia para estos polipéptidos parece relacionarse principalmente con la división de la segunda cadena pesada IgG.

Un cambio para un aminoácido positivo de G en la posición 131 se espera que produzca resultados similares a la sustitución N130R/K. Las posiciones 130 y 131 se sitúan en el bucle de una estructura de horquilla beta que abarca las posiciones 126 a 136 de la SEQ ID NO: 1. Basado en los resultados obtenidos aquí, los cambios a los aminoácidos positivos en cualquiera o ambas posiciones 130 y 131 se esperan que aumenten la actividad de proteasa cisteína IgG.

Ejemplo 3 – Evaluación de inmunogenicidad

Ensayo ADA 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 H₂SO₄ 0.5 M. Se midió 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 pCART183, 184, 185, 186, 187, 189 y 190 se muestran en la figura 5. Los resultados para pCART125 se muestran en la figura 6. Todos los polipéptidos probados muestran alguna reducción en el reconocimiento de anticuerpos anti-IdeS según se compara con IdeS, Normalmente por lo menos 10%. PCART185, 186 y 187 muestran en particular una mayor reducción en el reconocimiento, de aproximadamente 40% con relación a IdeS. PCART125 muestra una reducción de aproximadamente el 60%.

Resumen

Todos los polipéptidos probados muestran aumento de potencia y/o reducción de inmunogenicidad con relación al 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 la molécula IgG, se observa, es decir, la concentración en donde la mitad de las moléculas IgG 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 13).

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 Solución Salina Regulada con Fosfato -Tween (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

Potencia ELISA

Las curvas de respuesta de dosis resultante para las proteasas de cisteína IgG probadas en los ensayos de potencia se muestran en la figura 7 (división IgG1) y figura 8 (división IgG2). PCART125, 213 y 214 de los polipéptidos de ejemplo de la invención probados aquí tienen potencia mejorada con valores EC50 reducidos (tabla 1) en la división tanto de las cadenas de IgG1 (figura 7) e IgG2 (figura 8) en comparación con los controles IdeS pCART124, con una vez de mejor en la potencia en el corte IgG1 de 1.5 para pCART125, 2.2 para pCART214 y a lo sumo 3.0 para pCART213. Para división de IgG2 (figura 8), la mejora de veces en comparación con pCART124 (IdeS) fue 1.6 para pCART125, 2.1 para pCART214 y 3.5 para pCART213.

Ensayos de eficacia visualizados en gel

La división de IgG1 (figura 9A) e IgG2 (figura 9B) visualizados en gel muestra claramente la primera y segunda divisiones de cadena pesada (las líneas verticales en las figuras marcan la primera y segunda división de cadena pesadas IgG en

división BX1001865 y pCART124). El * en las figuras ilustra el valor EC50 aproximado, es decir, la concentración en donde el 50% del IgG es división sencilla (sclgG) y el 50% se divide completamente (F(ab')₂). Los datos de los geles se resumen en la tabla 2 (división IgG1) y tabla 3 (división IgG2). La concentración de la proteína de cisteína IgG necesaria para división de la primera cadena pesada de IgG1 (Humira) es aproximadamente igual para todos los polipéptidos probados, 1.5 ng/ml para BX1001865 y pCART124 (controles IdeS), pCART125, 213 y 214 (figura 9A). Para la segunda división de cadena pesada de IgG1 IdeS, pCART125 y 214 se necesitan aproximadamente 120 ng/ml, para obtener una banda F(ab')₂ dominante en los geles y aproximadamente una etapa de valoración menor, 40 ng/ml, para pCART213 9A). La división IgG2 (XGEVA) visualizada en la figura 9B muestra que todos los polipéptidos probados, BX1001865, pCART124, 125, 213 y 214, demuestran aproximadamente la misma eficacia con 14 ng/ml necesarios para cortar la primera cadena pesada IgG y generar sclgG2 y aproximadamente 370 ng/ml para generar fragmentos F(ab')₂ (tabla 3). En otro grupo de experimentos de eficacia se probó pCART228 contra Humira (IgG1) y XGEVA (IgG2) con BX1001865 y pCART124 como controles IdeS (figuras 10A y 10B, tabla 4). Aproximadamente se necesita una etapa de valoración de mayor concentración para los controles (BX1001865 y pCART124) en estos experimentos en comparación con la figura 9 y tabla 3, se pueden observar pequeñas diferencias entre experimentos debido al manejo de la muestra y precisión de laboratorio en diluciones de valoración de las muestras. Para obtener una comparación pCART228 confiable se debe comparar con la división de los controles IdeS en el mismo experimento. Se observan patrones de división IgG muy similares para pCART228 y los controles IdeS tanto en división IgG1 como IgG2 (figura 10A y B), pero con aproximadamente una división más eficiente 3x (una etapa de valoración) de la segunda cadena pesada IgG de IgG1 en pCART228 (figura 10A) con 120 ng/ml necesario en comparación con 370 ng/ml para IdeS (tabla 4).

Los polipéptidos de proteasa de cisteína IgG pCART125, 213 y 214 también se valoran en el grupo IgG humano, IVIg (Octagam) con IdeS (BX1001865 y pCART124) como controles (figura 11). Todos los polipéptidos probados necesitan 1.5 µg/ml para la primera división de cadena pesada IgG y aproximadamente 6 µg/ml para la segunda (figura 11 y tabla 5). La división de IVIg por pCART228 se analiza en un espectro de valoración más amplio con diluciones 1:2 de 30 µg/ml (figura 12) en comparación con variantes probadas en la figura 11. La misma eficacia se observa para IdeS (BX1001865 y pCART124) y pCART228 (figura 12) con una concentración de 1.9 µg/ml para generar sclgG y 7.5 µg/ml para dar fragmentos F(ab')₂ (tabla 6), estos representan las mismas etapas de valoración que para pCART125, 213 y 214 (figura 11 y Tabla 5).

Resumen de las figuras para el ejemplo 4

Figura 7 Curvas de titulación para división de IgG1 (Humira) mediante diferentes polipéptidos de proteasa de cisteína IgG.

Figura 8 Curvas de valoración para división de IgG2 (XGEVA) mediante diferentes polipéptidos de proteasa de cisteína IgG.

Figura 9 División de IgG analizada mediante SDS-PAGE utilizando cantidades para valoración (dilución 1: 3 a partir de 3300 ng/ml) de pCART125, 213 y 214, 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 donde la cantidad del producto dividido domina sobre el producto no dividido). El * en las figuras representa el valor EC50 aproximado en este experimento.

Figura 10 División de IgG analizada mediante SDS-PAGE utilizando cantidades para valoración (dilución 1: 3 de 3300 ng/ml) de pCART228 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 donde la cantidad del producto dividido domina sobre el producto no dividido).

Figura 11 División IVIg analizada por SDS - PAGE utilizando cantidades para valoración (dilución 1:2 de 6 µg/ml) de los polipéptidos de proteasa de cisteína IgG probados e IdeS (BX1001865 y pCART124) como control en el mismo experimento de división.

Figura 12 División IVIg analizada mediante SDS-PAGE utilizando cantidades valoradas (dilución 1:2 de 30 µg/ml) de pCART228 con IdeS (BX1001865 y pCART124) como controles en el mismo experimento de división.

Figura 13. Representación esquemática de la división de inmunoglobulinas mediante los polipéptidos de la invención. La división enzimática del IgG se realiza en dos etapas. Primera, una cadena pesada de IgG intacto se divide y se genera un único IgG dividido (sclgG). En segundo lugar, la siguiente cadena pesada IgG se corta y se libera la parte Fc. La parte Fc está unida aun a la parte Fab en la molécula sclgG y por lo tanto el anticuerpo detector en el ELISA de potencia es reconocer la parte Fc de la molécula IgG, el ensayo no diferencia entre IgG completo de sclgG.

Discusión y conclusión

Los menores valores EC50 para pCART125, 213 y 214 en el ELISA de potencia indican que estos polipéptidos tienen una potencia mejorada en la segunda división de cadena pesada (de sclgG a F(ab')₂) de IgG1 e IgG2 en comparación con

pCART124 (IdeS es original). Visualizar la división IgG en gel muestra el corte de la primera cadena pesada (de IgG a scIgG) que no se puede medir en el ELISA de potencia utilizando un anticuerpo detector específico para Fc. La mayoría de acciones mediadas por Fc de IgG se pierden en una única molécula dividida (datos no mostrados), que es central en la situación clínica en donde el foco principal es incapacitar moléculas IgG patogénicas. El PCART228 es efectivo tanto en división IgG1 como IgG2 como e IdeS original. Esto es importante cuando una proteasa de cisteína IgG del mismo tamaño molecular que el IdeS se necesita que tenga el reconocimiento inferior deseable de los anticuerpos específicos IdeS. IVIg es un grupo IgG humano que contiene aproximadamente 65-70% IgG1, 35-30% de IgG2 e IgG3/IgG4 que comparte aproximadamente el 1%. El IVIg humano también contiene naturalmente anticuerpos anti-IdeS, de exposición previa de donante IgG a *S. pyogenes*. Los anticuerpos anti-IdeS en IVIg humanos son de lejos neutralizantes ya que su unión al IdeS puede disminuir o demoler completamente la actividad de proteasa IgE y IdeS. Los resultados de la división IVIg muestran la división general de todas las subclases IgG diferentes, con una dominancia de IgG1 e IgG2, y con la presencia de anticuerpos anti-IdeS neutralizantes. En general, todos los polipéptidos de proteasa cisteína IgG probados tienen menor eficacia en división IgG2 en comparación con IgG1.

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	243	1	199	1
pCART125	165	1.5	125	1.6
pCART213	80	3.0	57	3.5
pCART214	111	2.2	95	2.1

Tabla 2. Datos para división IgG1 (Humira) mostrados en gel (figura 9A). 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 9A).

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	120	100
pCART124	1.5	120	100
pCART125	1.5	120	400-100
pCART213	1.5	40	40
pCART214	1.5	120	40-100

Tabla 3. Datos para división IgG2 (XGEVA) mostrados en el gel (figura 9B). 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 9B).

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
pCART125	14	370	100-400
pCART213	14	370	100-400

pCART214	14	370	100-400
----------	----	-----	---------

Tabla 4. Datos para división IgG1 (Humira) e IgG2 (XGEVA) mediante pCART228 mostrado en gel (figura 10). 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)	Primera 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
pCART228	4.6	120	40	1100

Tabla 5. Datos para división IVIg por pCART125, 213, y 214 mostrados en gel (figura 11). 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	Primera 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
pCART125	1500	6000
pCART213	1500	6000
pCART214	1500	6000

Tabla 6. Datos para división IVIg mediante pCART228 mostrado en gel (figura 12). 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	Primera 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 (pCART125, 213, y 214), 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 estreptococos del grupo A. Aquí se utilizan dos grupos de suero humano clínicos diferentes como estándares para detección de ADA. El primer grupo es suero humano normal 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 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 los polipéptidos de la invención, que se va a

5 ensayar para ADA, o con IdeS de control positivo (pCART124) en una relación molar de 1:100 con exceso 100x de polipéptidos de la invención. 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, estas variantes 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.

10 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 la invención se utilizan en una concentración de 100 veces la concentración ADA, que incluyen la diferencia de peso molar entre un anticuerpo de 150 kDa e IdeS 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 de la invención 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 polipéptidos probados 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 probados con el % de promedio de competición más bajo que la mayoría de epítomos de unión ADA se ha abolido en comparación con IdeS original (pCART124).

25 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.

30 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 IdeS (pCART124) o polipéptidos que se van a probar.

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

40 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 conclusión

45 Todos los polipéptidos de proteasa de cisteína IgG probados, pCART125, 213 y 214 son menos reconocidos por ADA específico para IdeS en suero humano en comparación con IdeS original (pCART124). Algunos de los epítomos de reconocimiento ADA se encuentran en la parte del terminal N del IdeS. Todos estos polipéptidos de la invención son eliminados en el terminal N en comparación con IdeS y la única diferencia secuencial entre pCART125 y el IdeS original es la eliminación del terminal N.

50 El porcentaje (%) de bloqueo de los sitios de unión IdeS-ADA para pCART125, 213 y 214 se muestran en las figuras 14 y 15 y se utiliza el pCART124 original como control positivo para semejanza del 100%.

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

55 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).

60 El IgIV humano se inyecta i.p. en el día 0. Veinticuatro horas (1 día) después de la inyección de IgIV humano, PBS, controles IdeS (BX1001865 y pCART124), o las proteasas de cisteína IgG que se van a probar, pCAR125, pCART213, pCART214, se administran intravenosamente, (i.v.) en una dosis de 1 mg/kg. Dos horas después se recolectan las muestras y se sacrifican los ratones.

65 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 2 anti humano 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 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

Se diluyó 10 µl de suero de ratón en 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 TM (CAT. #456-8096, Biorad). Los geles se someten a 200 V durante 40 min.

Resultados y conclusión

La división in vivo de IVIg humana (Octagam) mediante controles IdeS (BX1001865 y pCART124) y pCART125, 213 y 214 se comparan al estudiar el nivel de IgG humano en suero mediante ELISA de eficacia y al analizar la degradación de IgG mediante SDS-PAGE.

El tratamiento con controles IdeS (BX1001865 y pCART124) y las diferentes proteasas de cisteína IgG pCART125, pCART213 y pCART214 en ratones muestra un claro efecto de dividir el IgG humano in vivo (tabla 7 y figura 16).

La división completa se muestra para los controles IdeS (BX100186 y pCART124), pCART125 y pCART213, sin bandas scIgG visibles y bandas F(ab')₂ significativas en los geles (figura 17). El PCART214 muestra una menor eficacia en este modelo de ratón con moléculas scIgG presentes en el suero después de dos horas (* en la figura 17C). Sin embargo, no se puede detectar IVIg intacto en el gel, lo que significa que una barra más grande para pCART214 en la figura 16 representa scIgG y no IgG intacto. Esto muestra que los polipéptidos de la invención dividen el IgG en un modelo in vivo.

TABLA 7 Análisis de división in vivo de IgG humano en suero de ratones tratados con IdeS (BX1001865 y pCART124)/variantes IdeS 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
pCART125	0.38	0.39
pCART213	0.26	0.06
pCART214	1.29	0.05

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que tiene actividad de proteasa de cisteína IgG y que comprende una variante de la secuencia SEQ ID NO: 2, cuya variante:
- (A) es por lo menos 50% idéntica a la SEQ ID NO: 2;
- (B) tiene una cisteína (C) en la posición en dicha secuencia variante que corresponde a la posición 94 de la SEQ ID NO: 1; Y opcionalmente
- (C) tiene, en las posiciones en dicha secuencia variante que corresponde a la posición 84, 262, 284 y 286 de la SEQ ID NO: 1, 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 el IgG que el IdeS y/o es menos inmunogénico que el IdeS.
2. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha variante de la secuencia de la SEQ ID NO: 2:
- (1) tiene un aminoácido cargado positivamente en la posición en dicha variante que corresponde a la posición 130 de la SEQ ID NO: 1, 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 131 de la SEQ ID NO: 1, opcionalmente en el que dicho aminoácido cargado positivamente es arginina (R) o lisina (K); y/o
- (3) no incluye la secuencia NQTN contigua; y/o
- (4) no incluye la secuencia contigua DSFSANQEIR YSEVTPYHVT.
3. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha variante de la secuencia de la SEQ ID NO: 2 es por lo menos 80%, 90%, 95% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 2.
4. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende o consiste de la secuencia de una cualquiera de la SEQ ID NO: 3 a 16, opcionalmente en el que dicha secuencia incluye una metionina adicional en el terminal N y/o un marcador histidina en el terminal C.
5. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho polipéptido es 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 o 7.5 veces más, más efectivo que el IdeS en dividir IgG, cuando se mide en el mismo ensayo.
6. un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es menos inmunogénica que IdeS, en el que preferiblemente la inmunogenicidad de dicho polipéptido no es mayor del 85% de la inmunogenicidad del IdeS cuando se mide en el mismo ensayo.
7. un polinucleótido o vector de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleico que codifica un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
8. una célula anfitriona que comprende el polinucleótido o vector de expresión de la reivindicación 7, que preferiblemente es una célula bacteriana, más preferiblemente una célula de E. coli.
9. una composición que comprende un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y por lo menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
10. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal.
11. un método para la prevención o tratamiento de una enfermedad o afección en un sujeto, cuyo método comprende administrar al sujeto un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 al sujeto en una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva.
12. un método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicha enfermedad o afección mediada en todo o en parte por anticuerpos IgG patogénicos, preferiblemente en el que dicha enfermedad o afección se enumera en la tabla D.
13. Un método para división de IgG, el método comprende poner en contacto una muestra que contiene IgG con un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 bajo condiciones que permiten que ocurra la actividad de proteasa de cisteína IgG.

14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13 que se lleva a cabo ex vivo y/o se realiza para generar fragmentos Fc y Fab y/o en el que la muestra es una muestra de sangre tomada de un sujeto que sufre de una enfermedad o afección como se define en la reivindicación 12.

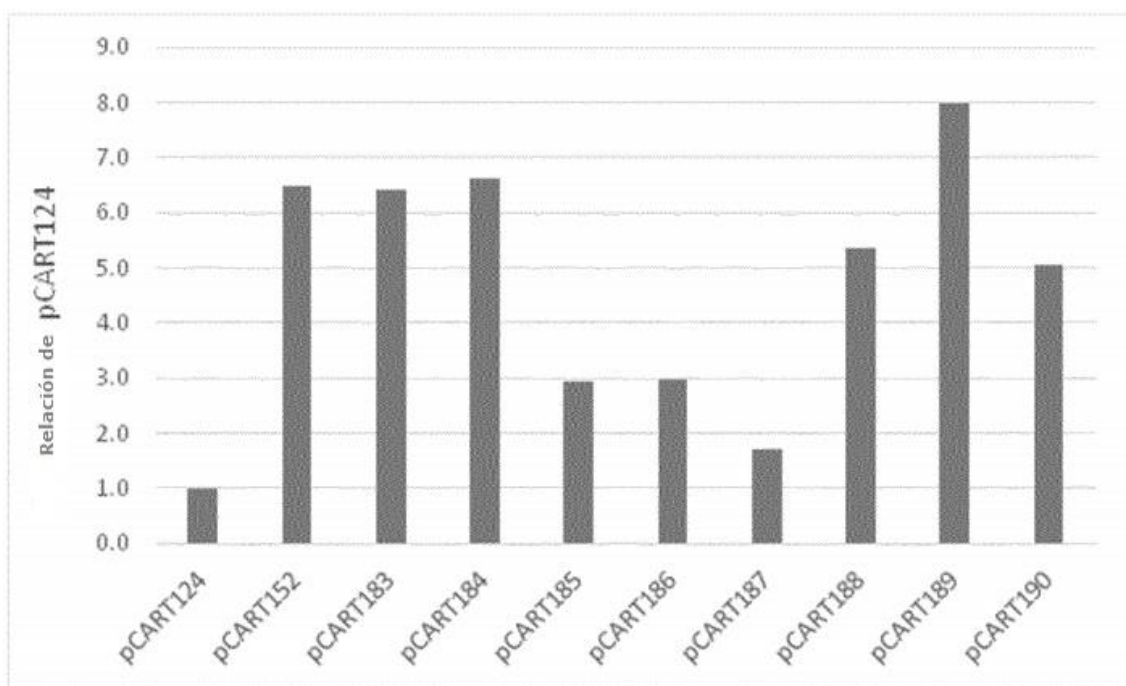


Figura 1

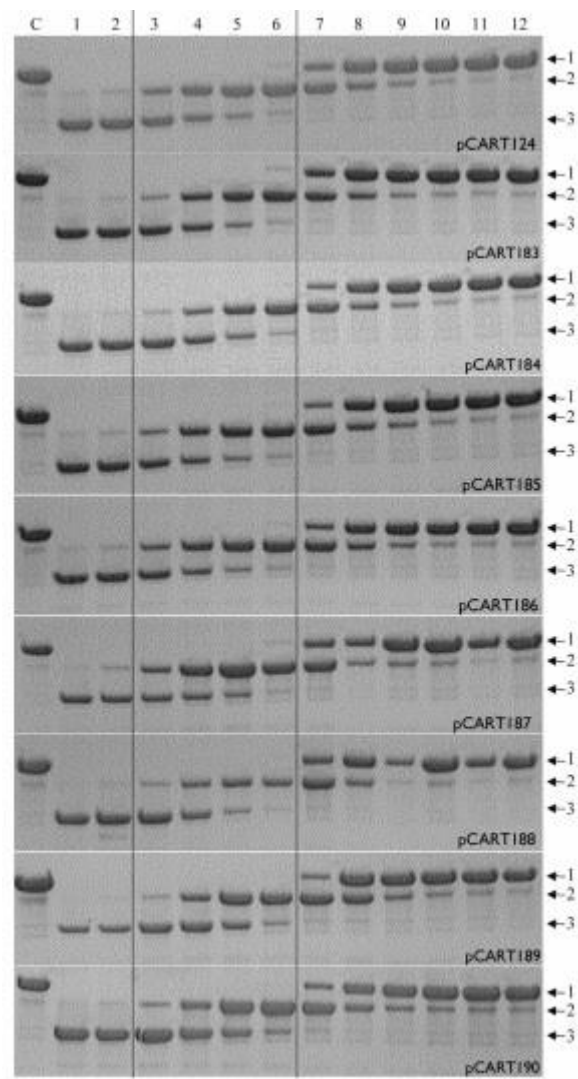


Figura 2

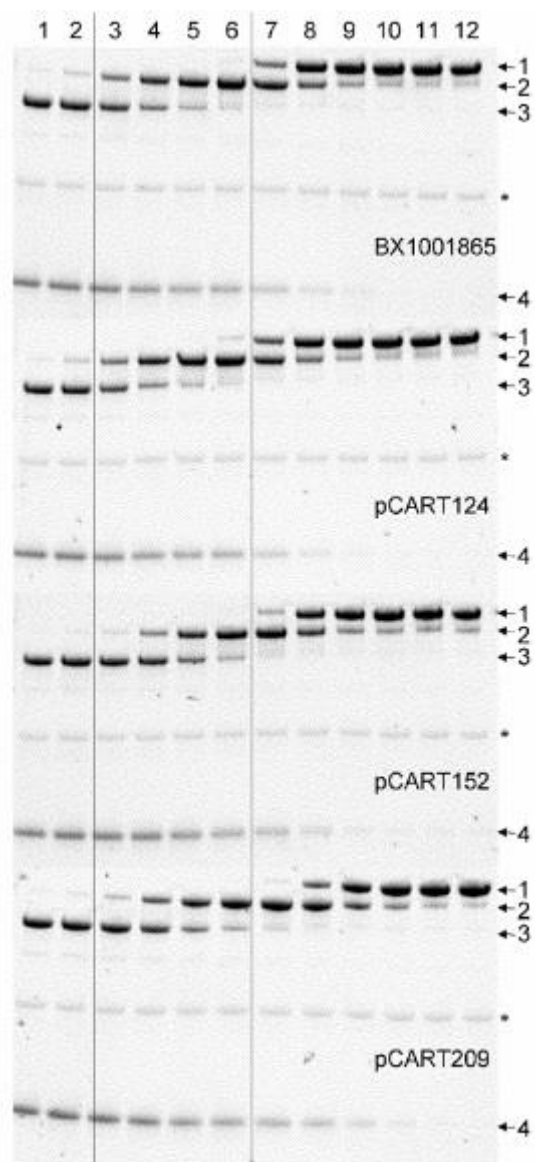


Figura 3

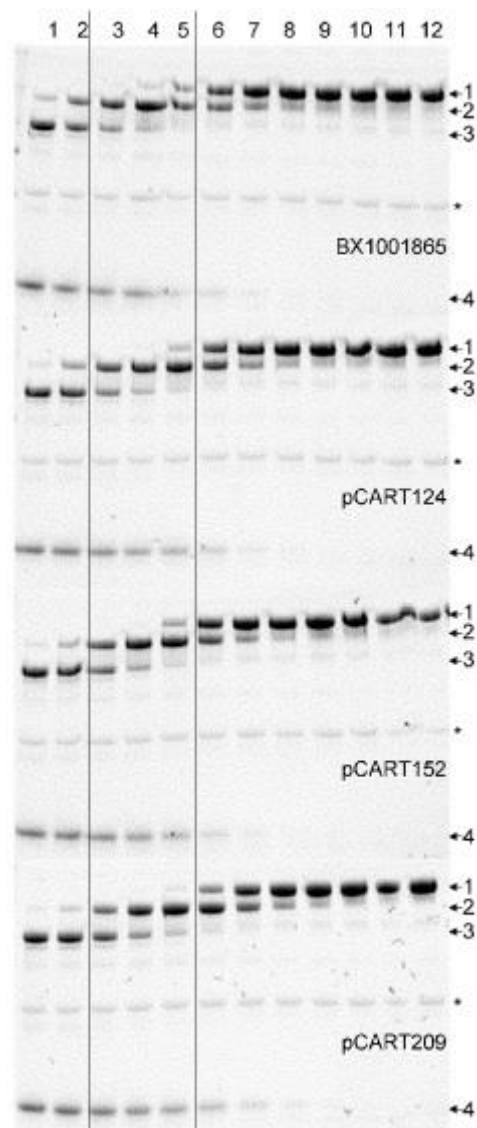


Figura 4

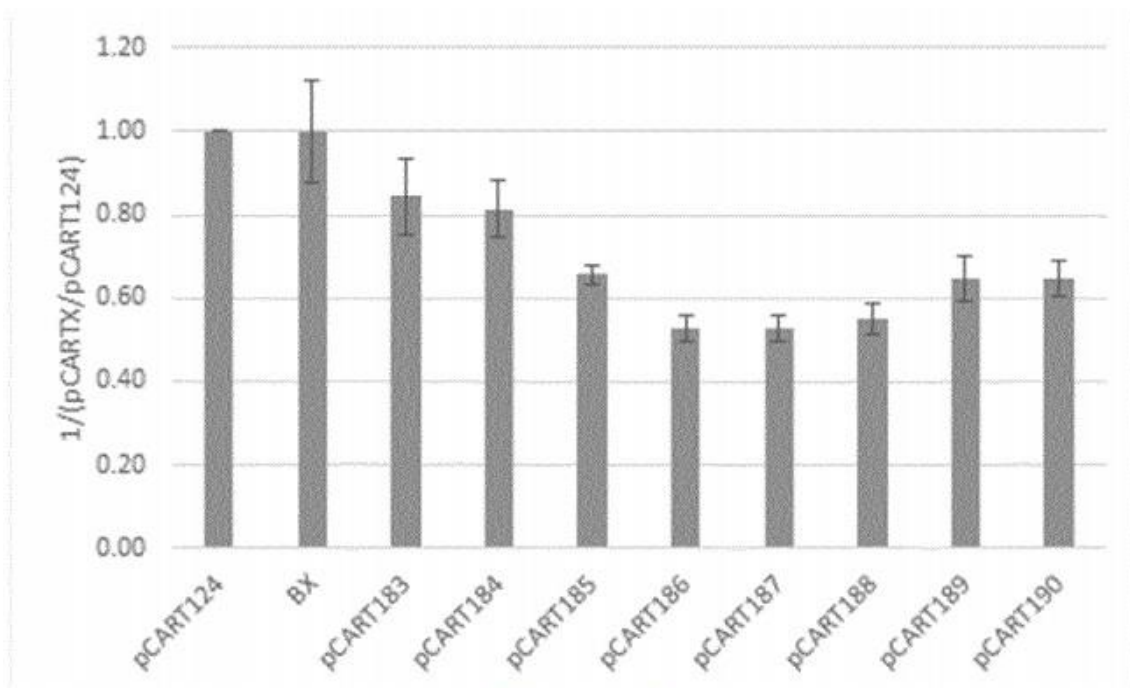


Figura 5

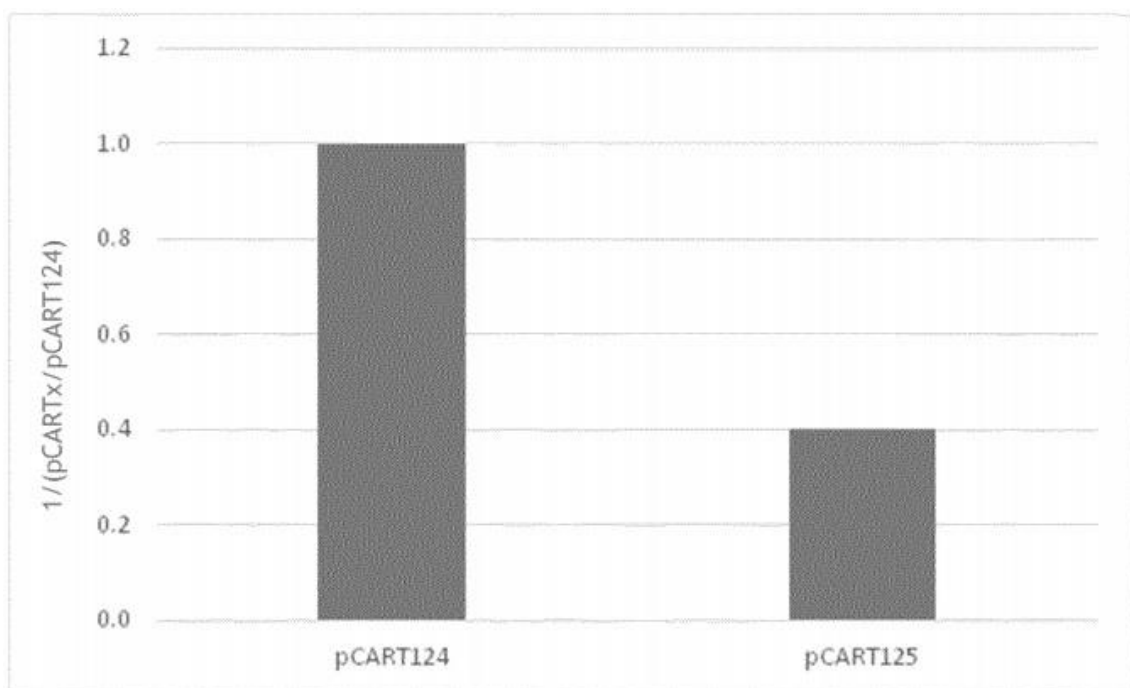


Figura 6

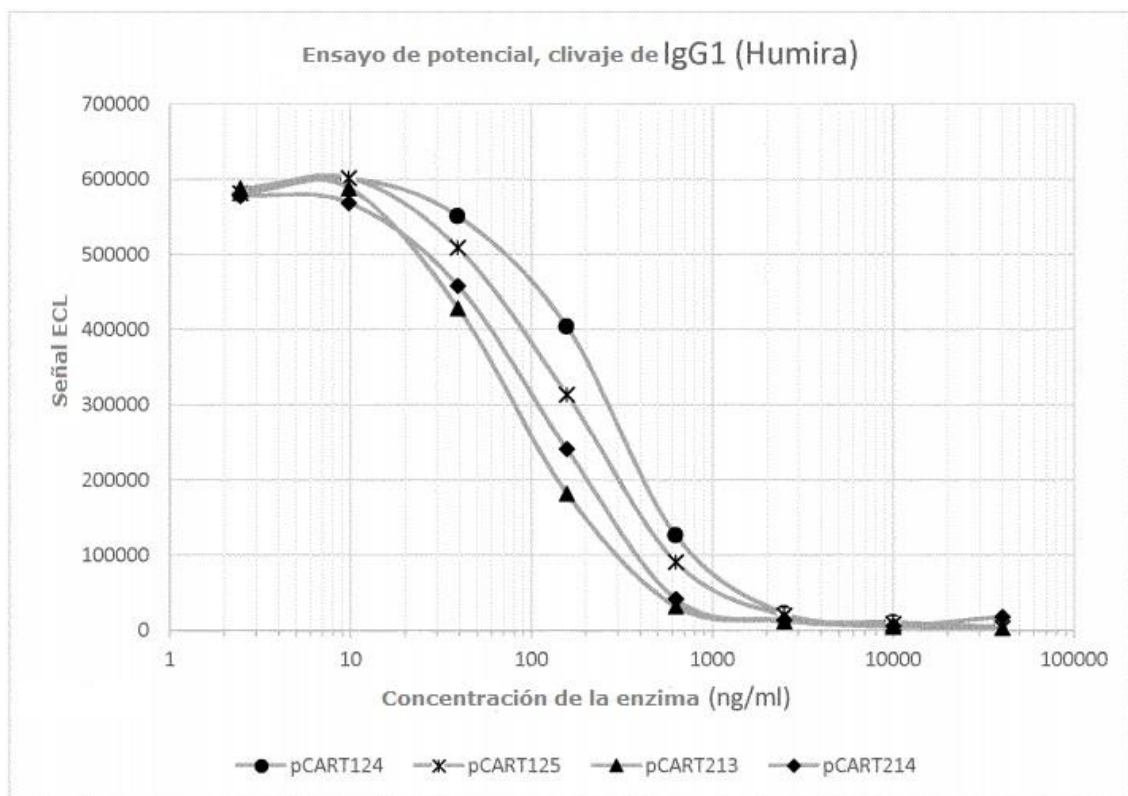


Figura 7

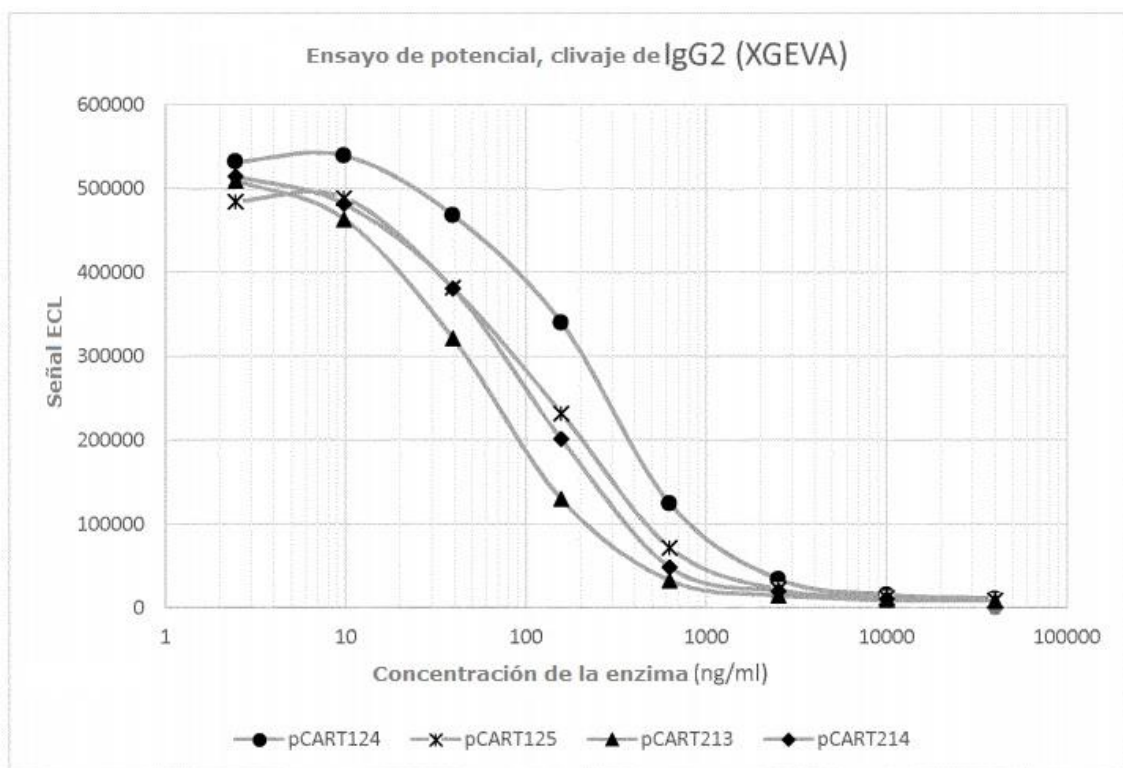


Figura 8

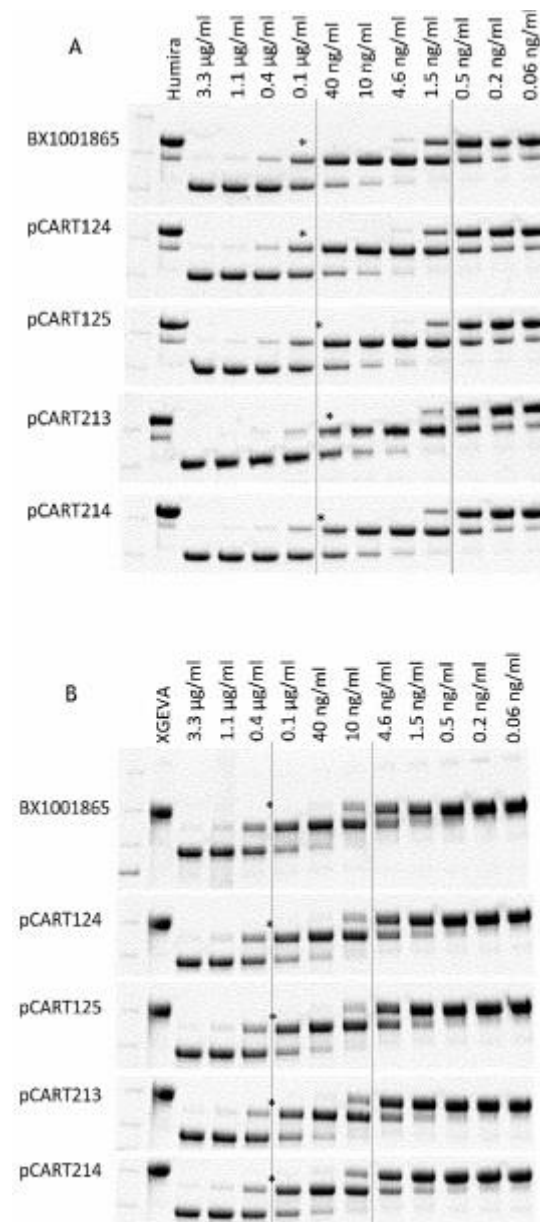


Figura 9

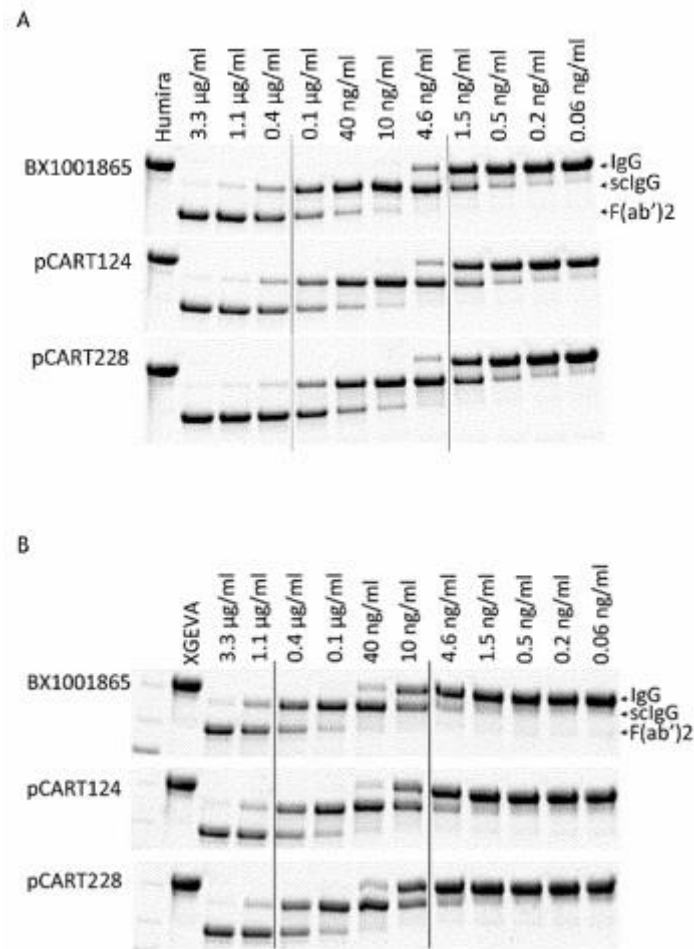


Figura 10

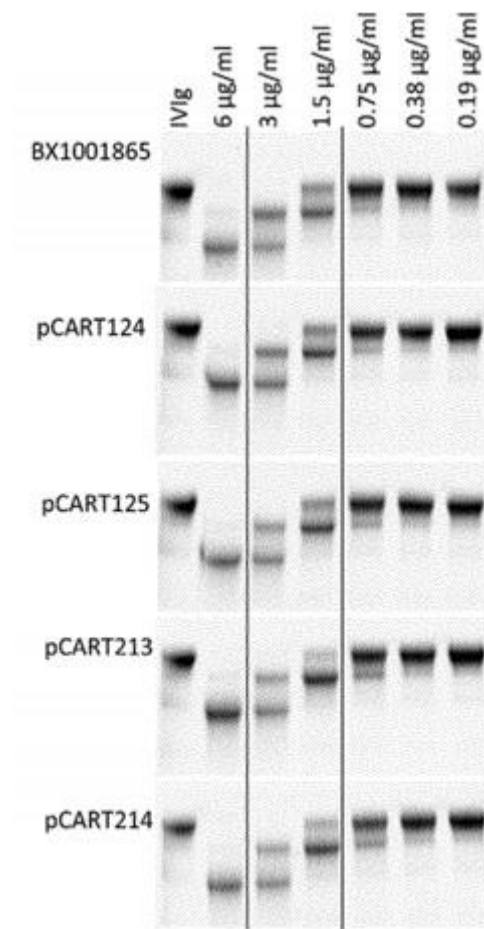


Figura 11

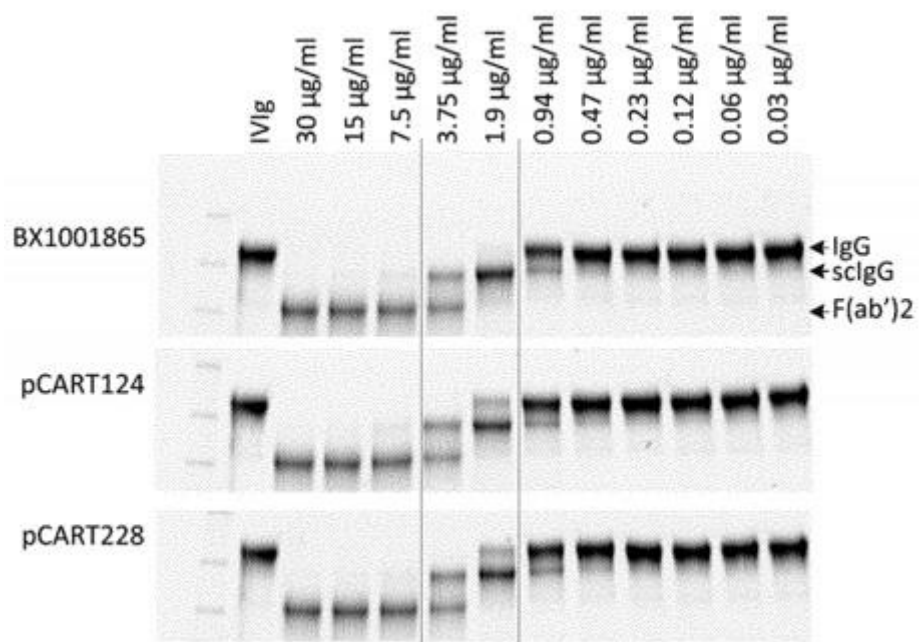


Figura 12

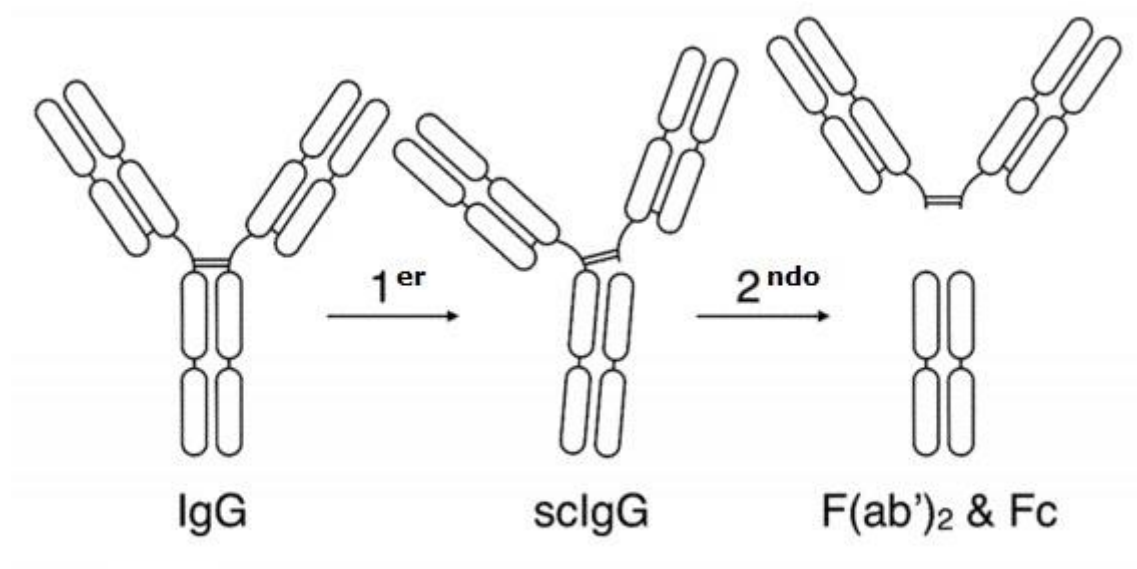


Figura 13

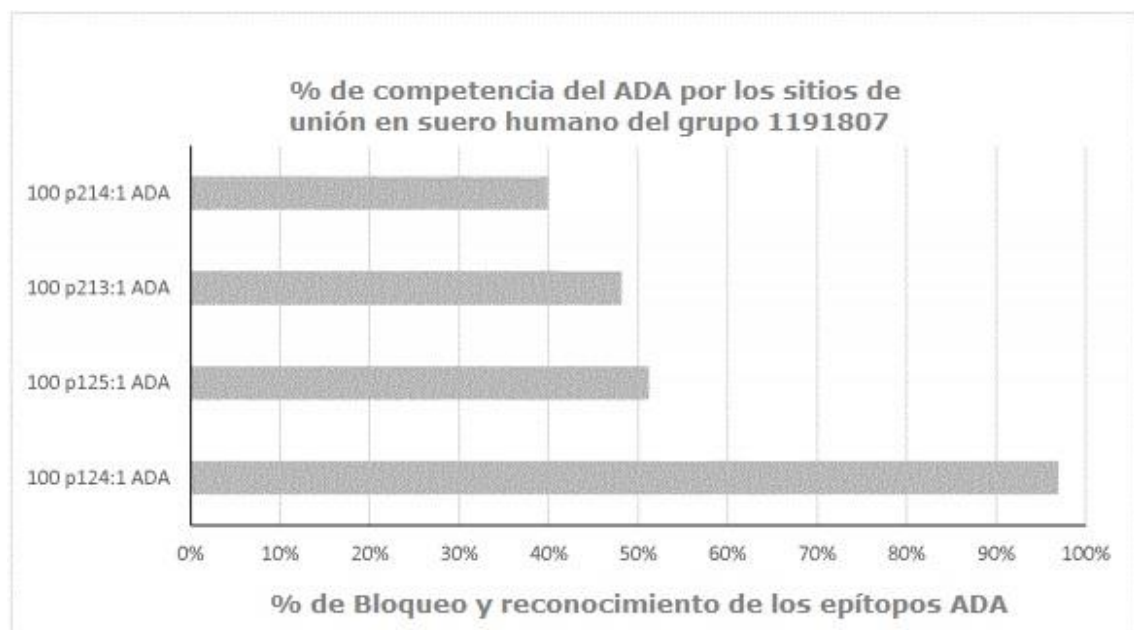


Figura 14



Figura 15

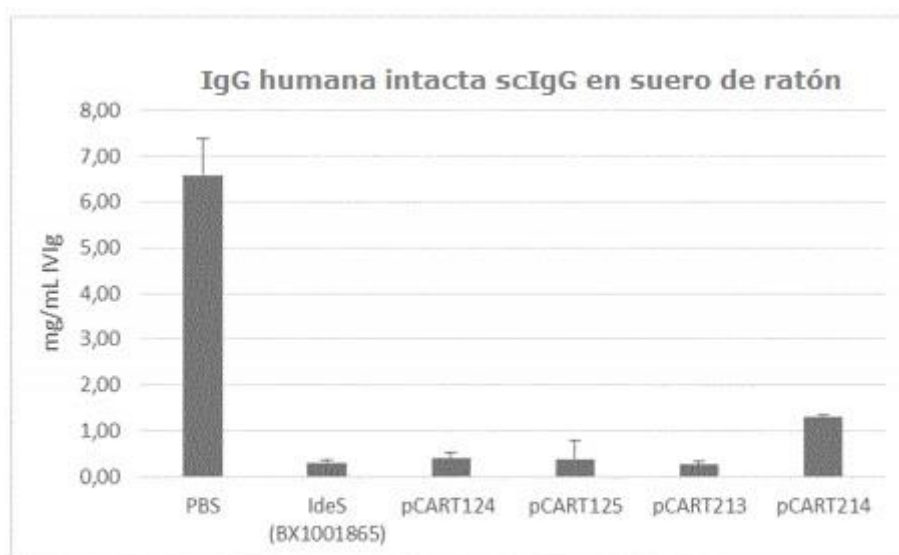


Figura 16

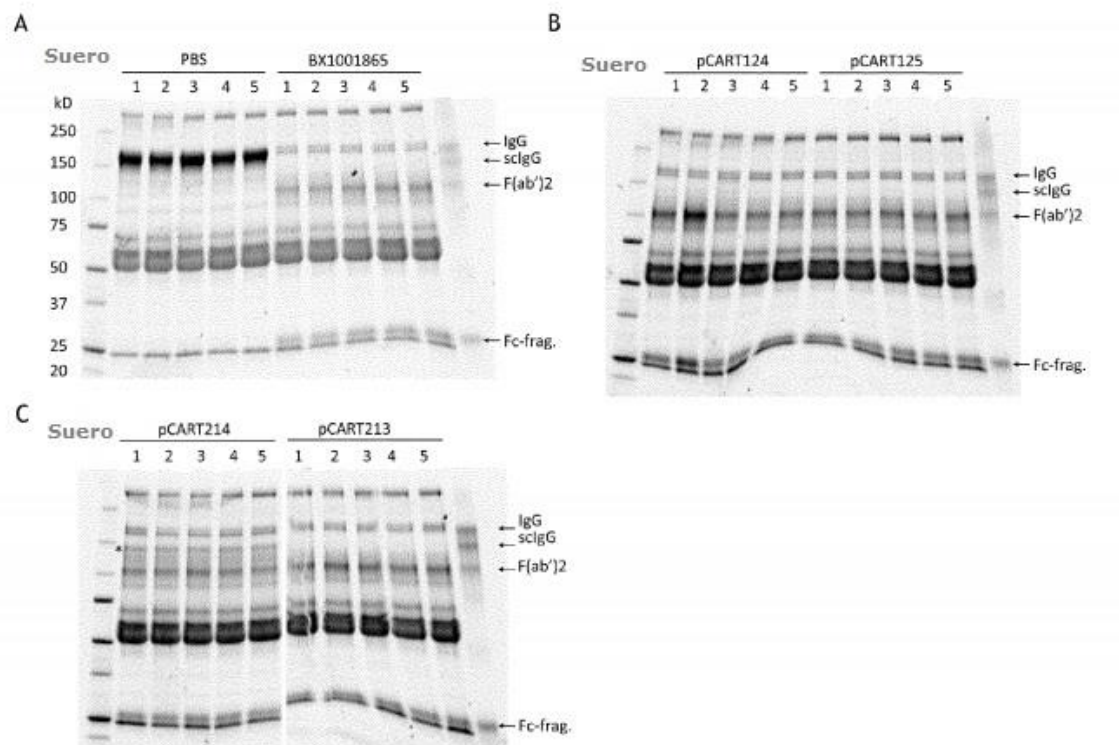


Figura 17

RESUMEN

La presente invención se refiere a un polipéptido novedoso que exhibe actividad de proteasa de cisteína de IgG y usos in vivo y ex vivo de los mismos. Usos del polipéptido incluyen métodos para la prevención o tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por IgG, y métodos para el análisis de IgG.

5