

MÉTODOS PARA TRATAR TRASTORNOS MEDIADOS POR ANTICUERPOS CON ANTAGONISTAS DE FcRn

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUD RELACIONADA

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente de los EE.UU. nº 62/878.541, presentada el 25 de julio de 2019, cuya descripción se incorpora en esta memoria como referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha entregado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora en esta memoria como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 23 de julio de 2020, se denomina 022548_WO062_SL.txt y tiene un tamaño de 8.193 bytes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La interacción de anticuerpos con el receptor de Fc neonatal (FcRn) es un determinante para mantener y prolongar la semivida en suero de anticuerpos y agentes terapéuticos obtenidos a partir de Fc. FcRn es un heterodímero de un dominio α similar a la clase I del MHC y una subunidad de β 2-microglobulina (β 2-m) que reconoce regiones en el dominio Fc de un anticuerpo, distintas de otros receptores de Fc γ (Fc γ R γ). Aunque FcRn se expresa en diversos tejidos, se cree que
20 actúa principalmente en el endotelio vascular y los riñones y en la barrera hematoencefálica.

 La unión de un anticuerpo a FcRn es altamente dependiente del pH y la interacción solamente tiene lugar con una afinidad elevada (de nanomolar alta a micromolar baja) a pH bajo (pH < 6,5), pero no a pH fisiológico (pH de
25 aproximadamente 7,4). Tras una acidificación del endosoma a un pH inferior a 6,5, la interacción entre IgG y FcRn llega a ser altamente favorable y es directamente responsable de inhibir la degradación y promover el reciclado de anticuerpos unidos a FcRn en la superficie celular. El aumento del pH debilita la interacción y favorece la liberación de los anticuerpos a la corriente sanguínea.

30 La modificación genética de Fc utilizando enfoques de mutagénesis de alto rendimiento se ha seguido realizando de forma extensa para identificar variantes que mejoran la afinidad de la unión a FcRn, ya que una unión mejorada presumiblemente conduciría a una eficacia incrementada y a una frecuencia de dosificación reducida de los anticuerpos terapéuticos, como resultado directo de una semivida en suero
35 prolongada, en comparación con anticuerpos de IgG de tipo silvestre. Sin embargo, las variantes que mejoran la afinidad de la unión a FcRn pueden tener resultados no

previstos. Por ejemplo, ciertas variantes de IgG que muestran grandes incrementos de la afinidad hacia FcRn a pH 6,0, tales como aquellas con las sustituciones N434W o P257I/Q311I, entre otras, tienen semividas en suero de tipo silvestre o gravemente reducidas en el macaco cangrejero (macaco cinomolgo en laboratorio) y en ratones transgénicos para FcRn humano (hFcRn) (véase, por ejemplo, Kuo et al., *Mabs*. (2011) 3(5): 422-30; Datta-Mannan et al., *J Biol Chem* (2007) 282:1709-17; y Datta-Mannan et al., *Metab Dispos.* (2007) 35:86-94). La variante T250Q/M428L (QL) ha mostrado resultados específicos de Fv en modelos animales (véase, por ejemplo, Datta-Mannan, 2007, *supra*; y Hinton et al., *J Immunol.* (2006) 176:346-56). La variante M252Y/S254T/T256E (YTE, numeración Eu) ha mostrado una mejora de 10 veces *in vitro*, pero presenta una citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos disminuida (ADCC) *in vivo*, debido a una reducción de 2 veces de la afinidad hacia el receptor FcγRIIIa (véase, por ejemplo, Dall'Acqua et al., *J Immunol.* (2002) 169(9):5171-80).

Las variantes de Fc que se unen a FcRn con mayor afinidad y una disminución de la dependencia del pH, pueden encontrar uso en incrementar el aclaramiento de las IgGs desde la circulación sanguínea. Se ha encontrado que el reciclado de IgG mediado por FcRn es el procedimiento dominante para mantener las concentraciones en plasma de IgG en los seres humanos (Xiao, *J Biomed Biotechnol.* (2012) 2012:282989). Sería deseable incrementar el aclaramiento de las IgGs desde la circulación, por ejemplo, en enfermedades autoinmunes tales como lupus eritematoso sistémico, en donde los anticuerpos autorreactivos circulantes causan una patología y en situaciones en las que toxinas, fármacos o agentes de diagnóstico que forman un complejo con IgG se tienen que aclarar rápidamente del cuerpo. Un aclaramiento incrementado de un anticuerpo no deseado se puede lograr utilizando un antagonista de FcRn, tal como un anticuerpo con un Fc modificado genéticamente, que se une a FcRn con afinidad elevada y no se disocia rápidamente a pH casi neutro. Esos anticuerpos modificados genéticamente se denominan Abdegs, por anticuerpos que mejoran la degradación de IgG (Swiercz et al., *J Nucl Med.* (2014) 55(7):1204-7). Esos antagonistas de FcRn no se liberarían desde las células, sino que se prevé que permanecerían unidos a FcRn y bloquearían la unión de otras IgGs de menor afinidad. Como resultado, la función de FcRn se bloquearía y las IgGs endógenas o no deseadas se dirigirían a la vía lisosómica para una degradación.

Existe una necesidad de métodos para tratar enfermedades mediadas por IgG mediante el uso de variantes de Fc que poseen una afinidad de unión mejorada hacia FcRn y que muestran una pérdida de la dependencia del pH para su unión a FcRn.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La presente descripción proporciona un método para tratar un trastorno mediado por anticuerpos (por ejemplo, mediado por IgG) en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto (por ejemplo, un ser humano) una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de FcRn que comprende un dominio Fc modificado. La cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista de FcRn aumentará la tasa de aclaramiento de IgG en suero en el sujeto tratado.

En algunas realizaciones, el dominio Fc modificado comprende una combinación de al menos cuatro sustituciones de aminoácidos que comprende: un ácido aspártico (D) o un ácido glutámico (E) en la posición del aminoácido 256 y un triptófano (W) o una glutamina (Q) en la posición del aminoácido 307, en donde la posición del aminoácido 254 no es treonina (T) y además comprende: una fenilalanina (F) o una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 434; y una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 252. A menos que se indique de otro modo, todas las posiciones de restos de Fc descritas en la presente memoria son de acuerdo con el sistema de numeración Eu.

En algunas realizaciones, el dominio Fc modificado comprende una combinación de restos de aminoácidos seleccionados a partir del grupo que consiste en: a) una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 252, un ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 256, una glutamina (Q) en la posición del aminoácido 307 y una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 434; b) una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 252, un ácido glutámico (E) en la posición del aminoácido 256, un triptófano (W) en la posición del aminoácido 307 y una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 434; c) una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 252, un ácido glutámico (E) en la posición del aminoácido 256, una glutamina (Q) en la posición del aminoácido 307 y una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 434; d) una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 252, un ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 256, una glutamina (Q) en la posición del aminoácido 307 y una fenilalanina (F) en la posición del aminoácido 434; e) una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 252, un ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 256; un triptófano (W) en la posición del aminoácido 307 y una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 434; f) una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 252, un ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 256, un triptófano (W) en la posición del aminoácido 307 y una fenilalanina (F) en la posición del aminoácido 434; g) una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 252 y una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 434; h) una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 252, un triptófano

(W) en la posición del aminoácido 307 y una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 434; i) una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 252, un ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 256 y una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 434; o j) un ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 256, un triptófano (W) en la posición del aminoácido 307 y una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 434.

En ciertas realizaciones, el dominio Fc modificado comprende una combinación de sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir del grupo que consiste en M252Y/T256D/T307Q/N434Y, M252Y/T256E/T307W/N434Y, M252Y/T256E/T307Q/N434Y, M252Y/T256D/T307Q/N434F, M252Y/T256D/T307W/N434Y, M252Y/T256D/T307W/N434F, M252Y/N434Y, M252Y/T307W/N434Y, M252Y/T256D/N434Y y T256D/307W/N434Y.

En ciertas realizaciones, el dominio Fc modificado es un dominio Fc modificado de IgG humana, tal como un dominio Fc modificado de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana o un dominio Fc obtenido a partir de uno o varios de los dominios Fc humanos.

En ciertas realizaciones, el dominio Fc modificado tiene afinidad para unirse a FcRn procedente de una o varias especies, tales como ser humano, mono, cerdo, ratón y rata. Por ejemplo, el dominio Fc modificado tiene afinidad para unirse tanto a FcRn humano (hFcRn) como a FcRn de rata (rFcRn).

En ciertas realizaciones, el dominio Fc modificado tiene una afinidad mejorada para unirse a FcRn (por ejemplo, afinidad mejorada para unirse a hFcRn), en comparación con un dominio Fc de tipo silvestre. En ciertas realizaciones ejemplificantes, el dominio Fc modificado tiene una afinidad mejorada para unirse a FcRn a pH ácido (por ejemplo, aproximadamente 6,0), en comparación con un dominio Fc de tipo silvestre. En ciertas realizaciones ejemplificantes, el dominio Fc modificado tiene una afinidad mejorada para unirse a FcRn a pH ácido, en comparación con un dominio Fc que tiene las mutaciones quintuples M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F ("YTEKF").

En ciertas realizaciones, el dominio Fc modificado tiene una afinidad mejorada para unirse a FcRn a pH no ácido (por ejemplo, aproximadamente 7,4), en comparación con un dominio Fc de tipo silvestre. En ciertas realizaciones ejemplificantes, el dominio Fc modificado tiene una afinidad mejorada para unirse a FcRn a pH no ácido, en comparación con un dominio Fc que tiene las mutaciones YTEKF.

En ciertas realizaciones, el dominio Fc modificado tiene una afinidad mejorada para unirse a FcRn a pH ácido y una afinidad mejorada para unirse a FcRn a pH no

ácido, en comparación con un dominio Fc de tipo silvestre. En ciertas realizaciones ejemplificantes, el dominio Fc modificado tiene una afinidad mejorada para unirse a FcRn a pH ácido y una afinidad mejorada para unirse a FcRn a pH no ácido, en comparación con un dominio Fc que tiene las mutaciones YTEKF.

5 En ciertas realizaciones, el dominio Fc modificado tiene una afinidad reducida para unirse a FcγRIIIa, en comparación con un dominio Fc de tipo silvestre.

 En ciertas realizaciones, el antagonista de FcRn es un polipéptido de unión tal como un anticuerpo o comprende un fragmento del mismo que se une a antígeno (por ejemplo, un fragmento Fv, un anticuerpo de cadena sencilla (ScFv), un Fab, un
10 Fab-H, un Fab' y un F(ab')₂). El polipéptido de unión puede tener una o varias dianas que no son FcRn.

 En algunas realizaciones, el trastorno mediado por IgG que se va a tratar con los presentes métodos es una enfermedad autoinmune. En ciertas realizaciones ejemplificantes, la enfermedad autoinmune se selecciona a partir del grupo que
15 consiste en enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD), lupus eritematoso sistémico (SLE), miastenia grave, esclerosis sistémica (SSc)/esclerodermia, artritis reumatoide, artritis psoriática, osteoartritis, diabetes, esclerosis múltiple, pénfigo vulgar, dermatitis atópica, psoriasis, asma, alergia, fibrosis pulmonar idiopática (IPF), púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) e hidradenitis supurativa.

20 En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona un método para mejorar la formación de imágenes para diagnóstico que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de FcRn descrito en el presente documento. En ciertas realizaciones, el método comprende además administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo radiomarcado. En otras
25 realizaciones, el antagonista de FcRn se administra después del anticuerpo radiomarcado y aumenta el contraste para el anticuerpo radiomarcado.

 En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona un método para reducir la exposición de un tejido no diana a un anticuerpo radiomarcado durante la formación de imágenes para diagnóstico, que comprende

30 administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de FcRn descrito en el presente documento.

 También se proporciona el uso de los antagonistas de FcRn en el presente documento para la preparación de un medicamento para uso en los presentes métodos de tratamiento y de diagnóstico, así como antagonistas de FcRn para uso
35 en los presentes métodos de tratamiento y diagnóstico.

 La presente descripción también proporciona ácidos nucleicos que codifican

los polipéptidos antagonistas de FcRn, vectores de expresión recombinantes y células hospedadoras para preparar los polipéptidos, y composiciones farmacéuticas que comprenden los antagonistas de FcRn descritos en el presente documento. También se proporcionan métodos para usar los antagonistas de FcRn de la presente descripción para tratar enfermedades.

Las características y ventajas anteriores y otras de la presente invención se comprenderán más completamente a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones ilustrativas, consideradas junto con los dibujos acompañantes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las FIGs. 1A y 1B representan la estructura de un FcRn que interacciona con una región Fc de IgG1. La FIG. 1A representa una interacción entre hFcRn y un Fc de IgG1 (pdb: 4n0u) que muestra un monómero de Fc (cinta gris oscura), que incluye la glicosilación mostrada como varillas etiquetadas con "Glicano", formando un complejo con el dominio α (gris) y las subunidades β 2-m de hFcRn (gris claro). Una mayoría de los restos de anticuerpo implicados en la interacción con FcRn se localizan en los bucles directamente adyacentes a la interfaz C_H2 - C_H3 (línea punteada) y opuestos al sitio de glicosilación. La FIG. 1B constituye una representación de la superficie de la estructura cristalina de Fc de IgG1 (pdb: 5d4q) girada 75° con respecto a la FIG. 1A. La interfaz que se une a FcRn está compuesta por restos en los dominios C_H2 y C_H3 . El banco por saturación se construyó en las once posiciones mostradas como varillas, tal y como se indica: M252; I253; S254; T256; K288; T307; K322; E380; L432; N434 e Y436. Todos esos restos están en estrecha proximidad o contacto directo con FcRn. Las superficies de los restos de histidina decisivos, responsables de la dependencia del pH (H310, H433, H435) se agrupan cerca de las posiciones de interés y son como se indican.

Las FIGs. 2A-D describen un ensayo de selección Octet y los resultados. La FIG. 2A presenta esquemáticamente un ensayo de selección Octet. Los biosensores NiNTA capturan el antígeno marcado con histidina y, posteriormente, las variantes de anticuerpo para las cinéticas de unión a FcRn de rata (rFcRn). La FIG. 2B representa los perfiles cinéticos de unión de rFcRn a pH 6,0 de tipo silvestre (línea continua), la variante T307A/E380A/N434A (AAA) (guiones cortos), los anticuerpos LS (guiones cortos intercalados con un solo punto), YTE (guiones largos), H435A (guiones largos intercalados con un solo punto) y H310A/H435Q (guiones largos intercalados con dos puntos), alineados con el inicio de la fase de asociación de rFcRn. Las variantes H435A y H310A/H435Q mostraban poca o ninguna unión a FcRn. La variante YTE tiene la tasa de disociación de FcRn más lenta, examinada

en el ensayo Octet de unión a rFcRn. La FIG. 2C representa gráficamente una normalización de las cinéticas de unión a FcRn a pH 6,0 a través de un subgrupo de mutantes obtenidos a partir de la selección Octet. La mayoría de los mutantes conservaban una unión significativa a rFcRn, pero varios se parecían al control simulado (línea punteada), indicando la pérdida de la totalidad de la unión a rFcRn (guiones largos, situadas por debajo de la línea punteada (simulación)). Dos variantes (N434F y N434Y; líneas continuas) tenían tasas de disociación de rFcRn más lentas. Dos variantes (líneas continuas) tenían tasas de disociación de rFcRn más lentas que el anticuerpo de tipo silvestre (guiones largos gruesos). La FIG. 2D representa un análisis de un gráfico de dispersión de las tasas de disociación de rFcRn para todas las mutaciones puntuales, con cinéticas de unión a rFcRn observables, separadas por la posición del resto. Las variantes por saturación se encuentran en uno de los siguientes cuatro regímenes de tasas de disociación de rFcRn: sin unión (no se muestra), unión más rápida (negro), unión similar al tipo silvestre (blanco), unión más lenta (gris). Dieciocho mutantes (E380C, K288D, K288N, M252Y, T256D, T256E, N434F, N434P, N434Y, T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q, T307W, Y436H, Y436N e Y436W) mostraban una tasa de disociación de rFcRn significativamente más lenta que el anticuerpo de tipo silvestre (líneas discontinuas negras).

La FIG. 3 representa gráficamente la cinética de Biacore™ de las variantes de referencia y de tipo silvestre con FcRns humanos y de rata a pH 6,0 y pH 7,4. Todas las curvas de unión a FcRn para la serie de concentraciones de tipo silvestre (izquierda superior), variante AAA (derecha superior), variante M428/N34S (LS) (izquierda inferior) y variante M252Y/S254T/T256E (YTE) (derecha inferior), se muestran para cada FcRn humano (primera y tercera columnas) y de rata (segunda y cuarta columnas) a pH 6,0 (primera y tercera filas) y a pH 7,4 (segunda y cuarta filas). Las variantes AAA, LS e YTE mostraban tasas de disociación de FcRn más lentas que el anticuerpo de tipo silvestre. En general, los anticuerpos se unen a rFcRn con una afinidad incrementada aproximadamente 10 veces, en comparación con el tipo silvestre. La variante LS tenía la afinidad más baja a pH 7,4 y la mayor unión residual a pH 7,4 con hFcRn, mientras que rFcRn se unía a la variante YTE más fuertemente.

La FIG. 4A representa gráficamente las cinéticas de Biacore™ de las variantes iniciales por saturación con FcRn humano y de rata a pH 6,0. Se muestran rastros de la cinética de unión a FcRn de las series de concentración para las 18 variantes por saturación iniciales. M252Y, T256D, T256E, N434F, N434P, N434Y,

T307A, T307E, T307F, T307Q y T307W tenían tasas de disociación más lentas tanto desde FcRn humano como de rata. Las variantes restantes solo eran específicas para FcRn de rata.

La FIG. 4B representa gráficamente las cinéticas de unión a FcRn de WT, la referencia y las variantes iniciales por saturación únicas con FcRn humano a pH 6,0. Sensogramas de la unión a FcRn con una serie de concentraciones de WT, LS, YTE y las 18 variantes por saturación con FcRn humano a pH 6,0. Las variantes por saturación únicas utilizadas para el banco por combinación están subrayadas y en negrita.

Las FIGs. 5A-D representan datos que muestran variantes múltiples que tienen tasas de disociación más lentas desde FcRn humano y de rata a pH 6,0. Las FIGs. 5A y 5B representan sensogramas de Biacore™ de diversas variantes. La FIG. 5A representa las tasas de disociación de FcRn humano a pH 6,0 para la variante YTE (guiones largos intercalados con un solo punto), variante LS (guiones largos intercalados con dos puntos), tipo silvestre (WT; línea punteada) y variantes por saturación iniciales (E380C, K288D, K288N, M252Y, T256D, T256E, N434F, N434P, N434Y, T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q, T307W, Y436H, Y436N e Y436W iniciales); (líneas continuas con varios sombreados). En la FIG. 5A, se representan sensogramas normalizados que muestran tasas de disociación mejoradas en comparación con el WT. La FIG. 5B representa las tasas de disociación de FcRn de rata a pH 6,0 para la variante AAA (puntos), variante LS (guiones intercalados con dos puntos), variante YTE (guiones intercalados con un único punto), tipo silvestre (línea continua) y las 18 variantes por saturación iniciales (líneas con guiones con diversas frecuencias y grosores). Para mayor claridad, se muestra una inyección representativa de cada uno de los once anticuerpos iniciales. Esas variantes únicas iniciales mostraban unas cinéticas de disociación mejoradas desde FcRn humano y de rata, en comparación con el tipo silvestre. La FIG. 5C y la FIG. 5D representan gráficas de afinidad de la unión de las 18 variantes de anticuerpos por saturación iniciales (círculos blancos) y de tipo silvestre (círculo negro) para FcRn humano (FIG. 5C) y de rata (FIG. 5D), utilizando las tasas de disociación y asociación obtenidas a partir de mediciones cinéticas de Biacore™. Se muestran las variantes de referencia: AAA (líneas diagonales de cara a la parte inferior derecha), LS (puntos) e YTE (líneas diagonales de cara a la parte inferior izquierda). A pesar de la mejora de la tasa de disociación de FcRn, una mayoría de las variantes no tienen una afinidad más fuerte hacia FcRn humano o de rata, debido a cinéticas de asociación más lentas. Once variantes tenían tasas de disociación más lentas desde ambas especies de FcRn.

Las FIGs. 6A-D representan datos que muestran que las combinaciones de las mutaciones por saturación iniciales mejoran adicionalmente las tasas de disociación de FcRn y las afinidades de unión. La FIG. 6A y la FIG. 6B describen sensogramas de Biacore™ representativos que muestran tasas de disociación de FcRn para FcRn humano y de rata, respectivamente. La FIG. 6A representa sensogramas normalizados para FcRn humano de una variante representativa de las variantes por combinación única (T256E; línea con guiones), doble (variante YETN (M252Y/T256E); línea gris clara continua), triple (variante MDQY (T256D/T307Q/N434Y); línea gris continua) y cuádruple (variante YEQY (M252Y/T256E/T307Q/N434Y); línea negra continua), en comparación con el tipo silvestre (línea punteada) y la variante LS (guiones largos intercalados con dos puntos). La FIG. 6B representa sensogramas normalizados para FcRn de rata de una variante representativa de las variantes por combinación única (guiones largos intercalados con dos puntos), doble (variante METF; guiones largos intercalados con un punto), triple (variante MEWY; guiones largos) y cuádruples (variante YDWF; guiones cortos), en comparación con el tipo silvestre (línea punteada) y la variante YTE (línea continua). La incorporación de mutaciones múltiples disminuía la tasa de disociación y mejoraba la afinidad de la unión a FcRn en mayor grado que las variantes de referencia. La FIG. 6C y la FIG. 6D representan gráficos de variantes por saturación de una combinación que muestran una tasa de disociación como una función de la tasa de disociación para FcRn humano (FIG. 6C) o de rata (FIG. 6C), que revelaba que una mayoría de las variantes poseía una unión mejorada a FcRn a pH 6,0, en comparación con las variantes de referencia. Las variantes con unión más fuerte a FcRn humano y de rata eran las combinaciones cuádruples (variantes YDWY, YDQY, YDWF, YEWY e YEQY, para hFcRn) y las combinaciones dobles (variantes YTTY, YTTF, MDTY, YDTF y MTWY, para rFcRn), respectivamente.

Las FIGs. 7A-D representan datos que muestran que la unión a FcRn mejorada a pH 6,0 altera la dependencia del pH de la interacción. La FIG. 7A y la FIG. 7B representan sensogramas representativos de las cinéticas de unión de Biacore™ a pH 7,4 de las variantes por combinación única (guiones largos intercalados con dos puntos), dobles (guiones largos intercalados con un punto), triple (guiones largos) y cuádruple (guiones cortos), en comparación con el tipo silvestre (línea punteada) y la variante LS (FIG. 7A, línea continua) y la variante YTE (FIG. 7B, línea continua). Incrementar el número de mutaciones potenciadoras de la unión a FcRn daba como resultado una mayor unión residual a pH fisiológico, en donde la mayoría de las variantes dobles, triples y cuádruples mostraban una unión

fuerte a ambas especies de FcRn. La FIG. 7C y la FIG. 7D representan gráficos de la unidad de resonancia en estado estacionario (UR;

$$UR = \text{desviación} + \frac{(\text{Rmáx} - \text{desviación}) * [\text{Anticuerpo}]}{[\text{Anticuerpo}] + K_{D,app}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

variantes por saturación con FcRn humano (FIG. 7C) o de rata (FIG. 7D) a pH 7,4, como una función de la afinidad de la unión a pH 6,0. En la FIG. 7C, se muestra una comparación de la unión a FcRn residual a pH 7,4 con la afinidad de la unión a FcRn a pH 6,0. Las combinaciones iniciales (MDQN, MDWN, YETN, YTWN, YDQN e YEQN) con propiedades de unión a FcRn mejoradas, ocupan el cuadrante izquierdo inferior, definido por la variante de referencia LS (rombo). En la FIG. 7D, las variantes LS (rombo) e YTE (triángulo) sirven como valor de corte para la validación inicial, respectivamente. Esas dos variantes tenían la afinidad de unión más fuerte a pH 6,0 y la mayor unión residual a pH 7,4 para FcRn humano y de rata, respectivamente. En ambas FIGs. 7C y 7D, se muestran variantes únicas (círculos blancos), dobles (círculos grises claros), triples (círculos grises oscuros) y cuádruples (círculos negros) así como la variante YTE (triángulo).

Las FIGs. 8A-C representan datos obtenidos a partir de una cromatografía por afinidad de FcRn y fluorimetría por barrido diferencial (DSF) de las variantes de referencia. La FIG. 8A representa los perfiles de elución normalizados para el WT (línea negra continua), AAA (línea punteada), LS (guiones largos intercalados con dos puntos), YTE (guiones largos intercalados con un punto), H435A (línea gris clara continua) y H310A/H435Q (AQ; línea gris oscura continua). El pH se observa en la parte superior del gráfico. Las variantes nulas de la unión a FcRn (H435A, H310A/H435Q) no se unen a la columna y eluyen en el flujo a través (<10 mL). Las variantes AAA, LS e YTE eluyen a un pH más alto que el anticuerpo WT. La FIG. 8B representa perfiles de DSF de las variantes WT (negro), LS (gris) e YTE (gris oscuro). YTE se desestabilizaba en comparación con WT y LS. La FIG. 8C representa perfiles de elución en columna de afinidad a FcRn de las siete variantes únicas iniciales, utilizadas para las variantes por combinación, en comparación con WT y las variantes LS (puntos verticales). Dos variantes (N434F/Y) eluyen a un pH más alto que LS, lo que significa una dependencia reducida del pH en la interacción con FcRn para variantes que contienen esas mutaciones.

Las FIGs. 9A-D representan datos que muestran que las variantes por combinación alteran significativamente la dependencia del pH y la estabilidad térmica. La FIG. 9A representa cromatogramas de afinidad de FcRn representativos de una variante única (guiones largos intercalados con dos puntos), doble (guiones largos intercalados con un solo punto), triple (guiones largos) y cuádruple (guiones

cortos). Incrementar el número de mutaciones potenciadoras de la unión a FcRn cambiaba la elución hacia valores de pH superiores; la variante LS (línea vertical discontinua corta). La FIG. 9B representa un diagrama de cajas del pH de elución para la saturación inicial y variantes por combinación, incluyendo los mutantes únicos (círculos blancos), dobles (líneas horizontales), triples (líneas verticales) y cuádruples (comprobados), lo que indicaba una tendencia hacia valores de pH superiores, con un número creciente de mutantes potenciadores de FcRn. La FIG. 9C muestra que la correlación elevada ($R^2 = 0,94$) entre el pH de elución de una cromatografía por afinidad a FcRn y la tasa de disociación de hFcRn utilizando Biacore™, revelaba una pérdida en la dependencia del pH de la interacción anticuerpo-FcRn con una cinética de disociación de FcRn mejorada. Las variantes AAA (líneas diagonales de cara a la parte inferior derecha), LS (línea punteada) e YTE (líneas diagonales de cara a la parte inferior izquierda) tenían valores similares de tasas de disociación de hFcRn y valores de pH de elución como las variantes dobles. La FIG. 9D representa un diagrama de cajas de la T_m obtenida a partir de DSF de las variantes combinadas por saturación que revelaba que las mutaciones potenciadoras de la unión a FcRn adicionales desestabilizan el anticuerpo, en comparación con WT, las variantes únicas o de referencia.

Las FIGs. 10A y 10B representan datos obtenidos a partir de una cromatografía por afinidad de FcRn y DSF de siete variantes iniciales. La FIG. 10A representa una cromatografía por afinidad a FcRn de las variantes M252Y (línea continua), T256D (guiones cortos intercalados con un punto), T256E (guiones largos), T307Q (guiones largos intercalados con un punto), T307W (guiones largos intercalados con dos puntos), N434F (línea punteada) y N434Y (guiones cortos). Los cromatogramas revelaron un cambio en el pH de la elución, en comparación con los anticuerpos de tipo silvestre y LS (líneas punteadas verticales). N434F y el N434Y tenían un pH de elución más alto (pH aproximadamente de 8,3) que la variante LS (línea punteada vertical). El pH en ciertos volúmenes de elución se indica por encima de los cromatogramas como referencia. La FIG. 10B representa perfiles DSF de siete variantes iniciales, que mostraban que ninguna de las siete variantes únicas iniciales desestabilizaba los anticuerpos con el mismo grado que la variante YTE (línea punteada vertical). Todas las variantes, excepto T307Q (guiones largos intercalados con un punto), se desestabilizaban en comparación con WT (línea punteada vertical).

Las FIGs. 11A-C representan datos que muestran que la unión a FcγRIIIa se reducía en las variantes por combinación que contenían M252Y. La FIG. 11A muestra sensogramas de la unión a FcγRIIIa de WT (negro), las variantes LS (gris) e YTE

(gris oscuro), que revelaban respuestas de unión reducidas por la variante YTE. La FIG. 11B representa un diagrama de cajas de las respuestas de unión a FcγRIIIa de las variantes de referencia, únicas y por combinación, tal y como se indica. Las variantes con las mutaciones M252Y contienen una respuesta de unión reducida a FcγRIIIa, incluyendo todas las variantes cuádruples. Las combinaciones con N434F/Y muestran normalmente una respuesta incrementada con FcγRIIIa. La FIG. 11C representa las respuestas de unión a FcγRIIIa de las siete variantes únicas iniciales, en comparación con WT y las variantes YTE (líneas de puntos horizontales). La mutación M252Y muestra una unión a FcγRIIIa reducida en comparación con WT, mientras que seis muestran una unión similar a WT o una unión incrementada a ese receptor.

Las FIGs. 12A-D representan datos obtenidos a partir de una cromatografía por afinidad a FcRn, DSF y unión a FcγRIIIa de siete variantes iniciales por combinación. La FIG. 12A representa cromatogramas de afinidad a FcRn de siete variantes iniciales por combinación, en comparación con el anticuerpo de tipo silvestre y la variante LS (línea punteada vertical y línea vertical continua respectivamente). Cada variante inicial tenía un pH de elución cercano al de la variante LS. La FIG. 12B muestra perfiles de DSF de las variantes iniciales por combinación, en comparación con las variantes YTE y de tipo silvestre (líneas punteadas verticales tal y como se indica). Seis de las siete variantes iniciales tenían una T_m que era similar o estaba más desestabilizada que la variante YTE: MDWN (guiones largos intercalados con dos puntos); YTDN (línea continua); YETN (guiones largos intercalados con un punto); YDQN (línea punteada); YEQN (guiones cortos intercalados con un punto). La variante MDQN tenía una T_m similar a la del anticuerpo de tipo silvestre (guiones cortos). La FIG. 12C representa los sensogramas de Biacore™ de las cinéticas de unión a FcγRIIIa de las siete variantes iniciales, en comparación con el tipo silvestre (línea punteada más grande) y la variante YTE (guiones largos gruesos). Las variantes que contienen M252Y, YTDN (línea continua), YDQN (guiones cortos intercalados con un punto), YTDN (guiones largos), YETN (guiones largos intercalados con un punto) e YEQN (línea punteada más corta), en donde cada una tenía una UR en estado estacionario reducido de una manera similar a YTE. La FIG. 12D muestra la UR en estado estacionario de las siete variantes iniciales, el tipo silvestre y la variante YTE. Solamente las variantes MDWN y MDQN poseían una afinidad similar hacia FcγRIIIa que el anticuerpo de tipo silvestre.

Las FIGs. 12E-H representan datos que muestran que tres variantes iniciales

mostraban una serie de atributos de anticuerpo clave. La FIG. 12E muestra perfiles de elución de cromatografía por afinidad de FcRn de las variantes DQ (línea continua), DW (línea punteada) e YD (línea con guiones), en comparación con WT y LS (líneas punteadas verticales). Cada variante doble mostraba un pH de elución entre WT y LS. La FIG. 12F representa los perfiles de fluorescencia de DSF de las tres variantes, en comparación con las variantes YTE y WT (líneas punteadas verticales) que revelaban que YD (línea con guiones) y DW (línea punteada) se desestabilizaban ligeramente, en comparación con YTE, pero DQ (línea continua) era similar al WT. La FIG. 12G representa sensogramas de la unión a FcγRIIIa en comparación con WT e YTE (línea punteada horizontal). YD (línea con guiones) mostraba una respuesta de unión similar a YTE, mientras que DQ (línea continua) y DW (línea punteada) mostraban una ligera reducción en comparación con el WT. La FIG. 12H representa datos que muestran que el ELISA por RF de puenteo homogéneo revelaba que las tres variantes iniciales e YTE mostraba una unión a RF significativamente reducida o similar a WT, a diferencia de LS. **p <0,001, *p <0,01.

Las FIGs. 13A-D representan datos que muestran una comparación de las cinéticas de unión a FcRn de las variantes iniciales por combinación a pH 6,0 y pH 7,4. Las FIGs. 13A y 13B muestran los sensogramas de unión a FcRn de Biacore™ de las variantes iniciales por combinación para FcRn humano (FIG. 13A) o FcRn de rata (FIG. 13B), en comparación con el tipo silvestre (línea punteada) y o bien LS (hFcRn, FIG. 13A, guiones largos gruesos) o YTE (rFcRn, FIG. 13B, guiones largos gruesos) a pH 6,0. Cada variante por combinación tenía una afinidad de unión total más fuerte al FcRn respectivo, a pesar de las tasas de asociación y disociación alteradas. La FIG. 13C y la FIG. 13D muestran sensogramas de FcRn con Biacore™ a pH 7,4. Cada variante inicial de hFcRn tenía una respuesta de unión a FcRn en estado estacionario similar o reducida, en comparación con la variante LS. Solamente las variantes MDWN y MDQN mostraban menos unión a rFcRn a pH 7,4 que la variante YTE.

La FIG. 14 es una tabla que representa las tasas de disociación de la unión a rFcRn Octet de un banco por saturación, de acuerdo con ciertas realizaciones con mutaciones únicas. Las especies de tipo silvestre (WT) y similar a tipo silvestre (similar-WT) se indican con rectángulos blancos; las especies de WT son como se indica. Las variantes con poca o ninguna unión a rFcRn en comparación con el tipo silvestre, están indicadas por rectángulos grises oscuros. Las variantes con tasa de disociación más rápida de rFcRn, en comparación con el tipo silvestre, están indicadas por rectángulos grises claros y las variantes con menores tasas de

disociación de rFcRn, en comparación con el tipo silvestre, están indicadas por rectángulos negros.

Las FIGs. 15A-C representan un nuevo ensayo de unión desarrollado utilizando un chip sensor CM5. La FIG. 15A es un esquema del ensayo. La FIG. 15B muestra una inmovilización directa de FcRn. La FIG. 15D muestra la captura de estreptavidina de FcRn biotinilado.

Las FIGs. 16A y 16B representan la unión a FcRn de mAb2 a pH 6,0. La FIG. 16A representa FcRn humano. La FIG. 16B representa FcRn de ratón.

Las FIGs. 17A y 17B representan la unión a FcRn de mAb2 a pH 7,4. La FIG. 17A representa FcRn humano. La FIG. 17B representa FcRn de ratón.

La FIG. 18 representa gráficamente la dependencia del pH de diversas variantes de mAb2. Las variantes iniciales conservaban una mayor afinidad de unión a pH 6 y una menor unión residual a pH 7,4 que LS.

La FIG. 19 representa una comparación de la dependencia del pH de la unión a FcRn utilizando las estructuras principales de mAb1 y mAb2. mAb1 y mAb2 son anticuerpos de IgG1 humana dirigidos a dos antígenos no relacionados.

La FIG. 20 representa una comparación de la estabilidad térmica utilizando las estructuras principales de mAb1 y mAb2.

La FIG. 21 representa una comparación de la unión a FcγRIIIa utilizando las estructuras principales de mAb1 y mAb2.

La FIG. 22 es un panel de gráficos que muestra que las variantes DQ, DW e YD eran transferibles entre las estructuras principales de IgG1. Los paneles a-c representan sensogramas de unión a FcRn normalizados a pH 6,0 en tres estructuras principales de IgG1 en donde el WT (gris claro), las variantes LS (gris oscuro), DQ (negro), DW (línea punteada) e YD (línea con guiones), muestran cinéticas similares a pH bajo. Estas tres variantes, DQ, DW e YD, poseían tasas de asociación y disociación ligeramente más rápidas que la variante LS, pero conservaban una afinidad de unión a FcRn más fuerte. Los paneles d-f representan sensogramas de unión a FcRn a pH 7,4; variante de referencia LS (negro). Los paneles g-i representan la respuesta de unión a FcRn a pH 7,4, en comparación con la afinidad de la unión a pH 6,0 para cada estructura principal de anticuerpo con WT (gris), las variantes LS (gris oscuro), DQ (negro), DW (vacío) e YD (cuadrado blanco). DQ, DW e YD muestran unas características de FcRn mejoradas, con una unión mejorada a pH 6,0 y una unión mínima a pH 7,4.

Las FIGs. 23A-C muestran que las tres variantes iniciales en la estructura principal de mAb2 mejoran de manera similar la unión a FcRn de cinomolgo. La FIG.

23A representa sensogramas de unión a cFcRn normalizados a pH 6,0 de WT (gris), LS (gris oscuro), DQ (negro), DW (línea punteada) e YD (línea con guiones) que muestran cinéticas de unión y afinidades similares a hFcRn. La FIG. 23B representa que la respuesta de unión a cFcRn para las tres variantes se reducía fuertemente a pH fisiológico; LS (gris oscuro), pero mostraba mayor unión que WT (gris) de una manera similar a hFcRn. La FIG. 23C representa una comparación de la respuesta de unión a cFcRn residual a pH 7,4 con la afinidad de la unión a cFcRn a pH 6,0 de WT (gris), LS (gris oscuro), DQ (negro), DW (vacío) e YD (cuadrado blanco), lo que revela que las tres variantes conservan las propiedades de unión a FcRn mejoradas observadas con hFcRn.

Las FIGs. 24A y 24B muestran que las variantes iniciales prolongaban la semivida en suero del anticuerpo. Perfiles farmacocinéticos de la concentración de anticuerpo en plasma como una función del tiempo en macaco cinomolgo (FIG. 24A) y ratón transgénico hFcRn (FIG. 24B) de los anticuerpos WT (círculos negros con línea negra continua), LS (círculos blancos con línea negra con guiones), DQ (círculos gris claro con línea gris clara continua), DW (círculos grises oscuros con línea gris oscura continua) e YD (círculos negros con línea negra punteada). Las tres variantes iniciales prolongan la semivida del anticuerpo en comparación con el WT

La FIG. 25 representa un gráfico de la UR en estado estacionario de todas las variantes por saturación con FcRn humano a pH 7,4 como una función de la afinidad de la unión a pH 6,0. Se muestra una comparación de la unión a FcRn residual a pH 7,4 con la afinidad de la unión a FcRn a pH 6,0. Se muestran combinaciones cuádruples con propiedades de unión a FcRn mejoradas a pH 6,0 y pH 7,4 en el cuadrante superior derecho del gráfico. Se muestran variantes únicas (círculos blancos), dobles (círculos gris claro), triples (círculos gris oscuro) y cuádruples (círculos negros), así como las variantes AAA de referencia, LS e YTE (como se indica).

La FIG. 26 representa un esquema del método CAPture de biotina utilizado para capturar FcRn biotinilado.

Las FIGs. 27A-G representan gráficos que muestran cinéticas de unión a pH 6,0, pH 7,4 y pH 8,0 de la referencia YTEKF (ABDEG™) y los antagonistas de FcRn como se indica. La FIG. 27A y la FIG. 27B muestran la unión dependiente de la concentración a FcRn humano y cyno FcRn, respectivamente, a pH 6,0 de WT, YTEKF y los antagonistas de FcRn. La FIG. 27C y la FIG. 27D muestran la unión dependiente de la concentración a FcRn humano y cyno FcRn, respectivamente, a pH 7,4, de WT, YTEKF y los antagonistas de FcRn. La FIG. 27E y la FIG. 27F

muestran la unión dependiente de la concentración a FcRn humano y cyno FcRn, respectivamente, a pH 8,0 de WT,YTEKF y antagonistas de FcRn. La FIG. 27G muestra la unión dependiente de la concentración a FcRn humano y de rata a pH 6,0 de las variantes YEQF e YEFW.

5 Las FIGs. 28A-H muestran las cinéticas de unión a FcRn humano de antagonistas de FcRn ejemplificantes (YDQY, YEWY, YEQY, YDQF, YDWY, YTWY, YDWF, YDTY, MDWY e YTTY), en comparación con la referencia YTEKF, con diversos niveles de pH. La FIG. 28A muestra sensogramas normalizados de los antagonistas de FcRn (negro) con una mejora significativa en la tasa de disociación desde hFcRn a pH 6,0, en comparación con el WT (línea con guiones) e YTEKF (línea punteada). La FIG. 28B muestra sensogramas para la unión a hFcRn a pH 7,4, que demuestran una unión significativa a pH elevado para los antagonistas de FcRn, en comparación con YTEKF y WT (sin unión). La FIG. 28C muestra una normalización de los sensogramas a pH 7,4, demostrando tasas de disociación significativas para los antagonistas de FcRn, en comparación con YTEKF. La FIG. 28D muestra sensogramas para la unión a hFcRn a pH 8,0, demostrando una unión significativa a pH más alto que las condiciones fisiológicas para los antagonistas de FcRn, en comparación con YTEKF y WT (sin unión). La FIG. 28E muestra una normalización de los sensogramas a pH 8,0, que demuestran tasas de disociación y afinidades medibles para los antagonistas de FcRn e YTEKF. La FIG. 28F muestra que un pH 9,0 era suficiente para perjudicar significativamente la unión a hFcRn de las variantes de antagonistas de FcRn y se asemejaba a la unión de WT a ese pH. La FIG. 28G muestra gráficos de isoafinidad de las afinidades de unión a hFcRn a pH 6,0 (negro), 7,4 (gris) y 8,0 (gris claro) de los antagonistas de FcRn, YTEKF (cuadrados blancos) y WT (pH 6,0 solamente). Múltiples variantes poseían mayores afinidades de unión a hFcRn que YTEKF a todos los pH. La FIG. 28H muestra la afinidad de la unión de los antagonistas de FcRn como una función del pH y demuestra una reducción de un orden de magnitud en la afinidad de la unión a hFcRn por unidad de pH.

30 Las FIGs. 29A-H muestran las cinéticas de unión a cyno FcRn (cFcRn) de los antagonistas de FcRn sometidos a ensayo en las FIGs. 28A-H, en comparación con la referencia YTEKF a diversos niveles de pH. La FIG. 29A muestra sensogramas normalizados de los antagonistas de FcRn (línea continua) que muestran una mejora significativa de la tasa de disociación desde cFcRn a pH 6,0, en comparación con WT (línea con guiones) e YTEKF (línea punteada). La FIG. 29B muestra sensogramas para la unión a cFcRn a pH 7,4 mostrando una unión significativa a pH

elevado para los antagonistas de FcRn, en comparación con YTEKF y WT (sin unión). La FIG. 29C muestra una normalización de los sensogramas a pH 7,4, demostrando tasas de disociación significativas para los antagonistas de FcRn, en comparación con YTEKF. La FIG. 29D muestra sensogramas para la unión a hFcRn a pH 8,0, mostrando una unión significativa a pH más alto que las condiciones fisiológicas para los antagonistas de FcRn, en comparación con YTEKF y WT (sin unión). La FIG. 29E muestra una normalización de los sensogramas a pH 8,0 que muestra tasas de disociación y afinidades medibles para los antagonistas de FcRn e YTEKF. La FIG. 29F muestra que un pH 9,0 era suficiente para perjudicar significativamente la unión a cFcRn de los antagonistas de FcRn y se asemejaba a la unión de WT a ese pH. La FIG. 29G muestra gráficos de isoafinidad de las afinidades de unión a cFcRn a pH 6,0 (negro), 7,4 (gris) y 8,0 (gris claro) de los antagonistas de FcRn, YTEKF (cuadrados blancos) y WT (pH 6,0 solamente). Las variantes múltiples poseían mayores afinidades de unión a cFcRn que YTEKF a todos los pH. La FIG. 29H muestra una afinidad de unión de los antagonistas de FcRn como una función del pH y demuestra una reducción de un orden de magnitud en la afinidad de la unión a cFcRn por unidad de pH.

Las FIGs. 30A-C son gráficos que muestran las concentraciones de hIgG del rastreador (WT) a lo largo del tiempo después de las dosis indicadas de la variante YDQY o YTEKF de hIgG1. La FIG. 30A muestra los perfiles de aclaramiento para todos los grupos. La FIG. 30B muestra los perfiles solo para el Grupo 2 (control) y el Grupo 6. La FIG. 30C muestra Los perfiles para el Grupo 2 (control), el Grupo 4 (YDQY hIgG1) y el Grupo 7 (YTEKF hIgG1).

Las FIGs. 31A y 31B son gráficos que muestran las concentraciones de proteína de la variante YDQY hIgG1 (A) o la variante YTEKF hIgG1 (B) a lo largo del tiempo, después de administrarlas a ratones en las dosis indicadas.

La FIG. 32 muestra una alineación de secuencias de las regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas de los restos 231-447 (numeración Eu). Las posiciones de la mutagénesis de FcRn descritas en la presente memoria (M252, T256, T307 y N434) se conservan en las cuatro subclases.

La FIG. 33 muestra parámetros de la caracterización de la unión a FcRn humano *in vitro* de las variantes de Fc que se unen a FcRn en condiciones de pH múltiples. Para cada variante, las mutaciones por sustitución en relación a la secuencia de WT (M252/T256/T307/N434; MTTN) están en negrita y subrayadas (por ejemplo, MDWY se refiere a una variante que tiene las mutaciones T256D, T307W y N434Y).

La FIG. 34 muestra parámetros de la caracterización de la unión a cyno *in vitro* de las variantes de Fc que se unen a FcRn en condiciones de pH múltiples.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente descripción proporciona polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos
5 monoclonales o fragmentos de los mismos) que tienen afinidades de unión a FcRn alteradas. Esos polipéptidos contienen un dominio Fc modificado de IgG que tiene una afinidad de unión a FcRn mejorada, en comparación con el dominio Fc de IgG de tipo silvestre (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) en condiciones tanto ácidas como no ácidas. De esta manera, a diferencia de un dominio Fc de IgG de
10 tipo silvestre, los presentes polipéptidos se unen a FcRn de una manera que es menos dependiente del pH. Esos polipéptidos permanecen unidos a FcRn a medida que el FcRn transita entre la superficie celular y el citoplasma, que tienen diferentes condiciones de pH. Como resultado, otras moléculas de IgG (por ejemplo, IgG sérica), que tienen afinidades de unión a FcRn de tipo silvestre (menores), se
15 bloquean para la unión a FcRn y se dirigen con una tasa incrementada a las rutas lisosómicas para una degradación, lo cual conduce a un aclaramiento más rápido de las moléculas de IgG corporales.

Debido a la alteración de la función normal de los FcRn en la mediación de la recirculación de IgG y la conservación de los niveles de IgG en suero, los presentes
20 polipéptidos se denominan “antagonistas de FcRn”. Un antagonista de FcRn de la presente descripción puede ser un anticuerpo, una inmunoadhesina u otra forma de proteína de fusión de Fc o un fragmento de Fc o una porción del mismo. El antagonista de FcRn puede ser, por ejemplo, una proteína monomérica o una proteína dimérica (hetero-dimérica u homo-dimérica). Debido a que los antagonistas
25 de FcRn aumentan el aclaramiento de la IgG sérica desde el cuerpo, se pueden usar en el tratamiento de pacientes que padecen enfermedades o trastornos mediados por IgG (por ejemplo, enfermedades autoinmunes) o en la eliminación del cuerpo de IgGs no deseadas (por ejemplo, un anticuerpo terapéutico o de diagnóstico que ya no es necesario o beneficioso).

30 Se debe entender que los métodos descritos en esta descripción no están limitados a los métodos particulares y a las condiciones experimentales descritas en la misma, ya que tales métodos y condiciones pueden variar. También se debe entender que la terminología utilizada en la presente memoria es solo con el fin de describir realizaciones particulares y no se pretende que sea limitante.

35 Además, los experimentos descritos en la presente memoria, a menos que se indique lo contrario, utilizan técnicas convencionales de biología molecular y celular

y de inmunología, dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas son bien conocidas por el experto en el campo y se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Ausubel et al., compiladores, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc, NY, N.Y. (1987-2008), incluyendo todos los suplementos; Green et al., compiladores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (cuarta edición); Antibodies: A Laboratory Manual, capítulo 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (2013, 2ª edición).

A menos que se defina de otra manera, los términos científicos y técnicos utilizados en la presente memoria tienen los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica. En caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en la presente memoria tienen prioridad sobre cualquier diccionario o definición extrínseca. A menos que se requiera de otra manera por el contexto, los términos singulares incluirán los plurales y los términos plurales incluirán los singulares. A menos que se indique lo contrario, el uso del término “que incluye”, así como otras formas, tales como “incluye” e “incluido”, no es limitante. Las palabras “tener” y “comprender” o variaciones tales como “tiene”, “que tiene”, “comprende” o “que comprende”, se entenderá que implican la inclusión de un número entero o un grupo de números enteros establecido, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

En general, la nomenclatura utilizada en relación con el cultivo celular y tisular, la biología molecular, la inmunología, la microbiología, la genética y la química de ácidos nucleicos y proteínas y la hibridación, descrita en esta memoria, es bien conocida y comúnmente utilizada en la técnica. Los métodos y las técnicas proporcionadas en la presente memoria se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y tal y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y describen a lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las explicaciones del fabricante, tal y como se llevan a cabo comúnmente en la técnica o como se describen en la presente memoria. Las nomenclaturas relacionadas utilizadas y los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritos en la presente memoria, son bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Se utilizan técnicas convencionales para las síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y suministro, y tratamiento de pacientes. Todas las publicaciones y otras referencias mencionadas en la presente memoria se

incorporan como referencia en su totalidad. De modo que la descripción pueda comprenderse más fácilmente, a continuación se definen unos términos seleccionados.

El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos e incluye proteínas naturales o artificiales, análogos de polipéptidos o variantes de una secuencia de proteínas o fragmentos de las mismas, a menos que se indique de otra manera en el contexto. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico; es decir, el término incluye una proteína que tiene una o varias cadenas polipeptídicas acopladas covalentemente o no acopladas covalentemente. Un fragmento de polipéptido comprende al menos aproximadamente 5 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 15 aminoácidos contiguos o al menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos, por ejemplo.

La expresión "proteína aislada" o "polipéptido aislado" se refiere a una proteína o un polipéptido que en virtud de su origen o fuente de obtención, no se asocia con los componentes naturalmente asociados que lo acompañan en su estado natural; está sustancialmente exento de otras proteínas de la misma especie; se expresa a través de una célula de una especie diferente; o no está presente en la naturaleza. Por tanto, una proteína o un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula a partir de la cual se origina de manera natural, estará "aislado" de sus componentes con los que se asocia naturalmente. Una proteína o un polipéptido también se puede hacer que esté sustancialmente exento de componentes con los que se asocia naturalmente mediante aislamiento, utilizando métodos de purificación de proteínas bien conocidos en la técnica.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la expresión "proteína de unión" o polipéptido de unión" se referirá a una proteína o un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o una inmunoadhesina) que contiene al menos un sitio de unión que es responsable de la unión selectiva a un antígeno diana de interés (por ejemplo, un antígeno diana humano). Los sitios de unión ejemplificantes incluyen un dominio variable de anticuerpo, un sitio de unión a ligando de un receptor o un sitio de unión a un receptor de un ligando. En ciertos aspectos, las proteínas de unión o los polipéptidos de unión comprenden múltiples (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más) sitios de unión. En ciertos aspectos, la proteína de unión o el polipéptido de unión no es una enzima terapéutica.

El término "ligando" se refiere a cualquier sustancia capaz de unirse o de que

sea unida, a otra sustancia. De manera similar, el término “antígeno” se refiere a cualquier sustancia contra la que se puede generar un anticuerpo. Aunque “antígeno” se usa comúnmente haciendo referencia a un sustrato que se une a un anticuerpo, y “ligando” a menudo se usa haciendo referencia a sustratos que se unen a un receptor, esos términos no se distinguen entre sí e incluyen una amplia gama de entidades químicas solapantes. Para evitar dudas, antígeno y ligando se utilizan de manera intercambiable a lo largo de la presente memoria. Los antígenos/ligandos pueden ser un péptido, un polipéptido, una proteína, un aptámero, un polisacárido, una molécula de azúcar, un carbohidrato, un lípido, un oligonucleótido, un polinucleótido, una molécula sintética, una molécula inorgánica, una molécula orgánica y cualquier combinación de los mismos.

La expresión “se une específicamente”, tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la capacidad de un anticuerpo o una inmunoadhesina para unirse a un antígeno con una constante de disociación (K_d) de como máximo aproximadamente 1×10^{-6} M, aproximadamente 1×10^{-7} M, aproximadamente 1×10^{-8} M, aproximadamente 1×10^{-9} M, aproximadamente 1×10^{-10} M, aproximadamente 1×10^{-11} M, aproximadamente 1×10^{-12} M o menos, y/o para unirse a un antígeno con una afinidad que es al menos aproximadamente dos veces mayor que su afinidad hacia un antígeno no específico.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término “anticuerpo” se refiere a estructuras tales (por ejemplo, moléculas de anticuerpo intactas, inmunoadhesinas o variantes de las mismas) que tienen una actividad inmunoreactiva específica conocida significativa, frente a un antígeno de interés. Los anticuerpos y las inmunoglobulinas comprenden cadenas ligeras y pesadas, con o sin un enlace covalente intercatenario entre ellas. Las estructuras de inmunoglobulina básicas en los sistemas de vertebrados se conocen relativamente bien.

Tal y como se va a detallar con mayor precisión más adelante, el término genérico “anticuerpo” comprende cinco clases distintas de anticuerpos que se pueden distinguir bioquímicamente. Aunque las cinco clases de anticuerpos están claramente dentro del alcance de la presente descripción, la descripción de la presente memoria estará dirigida en general a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a IgG, las inmunoglobulinas comprenden dos cadenas ligeras idénticas con un peso molecular de aproximadamente 23.000 Dalton y dos cadenas pesadas idénticas con un peso molecular de 53.000-70.000. Las cuatro cadenas están unidas por enlaces disulfuro en una configuración en forma de “Y”, en donde las cadenas ligeras sostienen las cadenas pesadas empezando en la

bisagra de la “Y” y continuando a través de la región variable.

Las cadenas ligeras de inmunoglobulina se clasifican como kappa (κ) o lambda (λ). Cada clase de cadena pesada puede estar unida a una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas se unen covalentemente entre sí y las porciones de la “cola” de las dos cadenas pesadas se unen entre sí por enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes, cuando las inmunoglobulinas se generan mediante hibridomas, linfocitos B o células hospedadoras modificadas genéticamente. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos se organizan desde un extremo N-terminal en los extremos bifurcados de la configuración en Y hasta el extremo C-terminal en la parte inferior de cada cadena. Los expertos en la técnica apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma (γ), mu (μ), alfa (α), delta (δ) o epsilon (ϵ), con algunas subclases entre ellas (por ejemplo, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). La naturaleza de esa cadena es la que determina la “clase” o el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgG o IgE, respectivamente. Las subclases o subtipos de isotipos de inmunoglobulinas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc.) están bien caracterizados y se sabe que confieren una especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de esas clases e isotipos son fácilmente discernibles para un experto en la materia, de cara a la presente descripción y, por consiguiente, están dentro del alcance de la presente descripción.

Tanto las cadenas ligeras como las pesadas se dividen en regiones de homología estructural y funcional. El término “región” se refiere a una parte o una porción de una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo e incluye regiones constantes o regiones variables, así como partes o porciones más discretas de dichas regiones. Por ejemplo, las regiones variables de la cadena ligera incluyen “regiones determinantes de la complementariedad” o “CDRs”, intercaladas entre las regiones “estructurales” o “FRs”, de acuerdo con lo definido en la presente memoria.

Las regiones de una cadena pesada o ligera de una inmunoglobulina se pueden definir como regiones “constantes” (C) o “variables” (V), basándose en una falta relativa de variación de secuencia dentro de las regiones de varios miembros de una clase, en el caso de una “región constante” o basándose en una variación significativa dentro de las regiones de varios miembros de una clase, en el caso de una “región variable”. Las expresiones “región constante” y “región variable” también se pueden usar funcionalmente. A este respecto, se apreciará que las regiones variables de una inmunoglobulina o un anticuerpo determinan el reconocimiento de un antígeno y la especificidad. Por el contrario, las regiones constantes de una inmunoglobulina o un anticuerpo confieren importantes funciones efectoras tales

como la secreción, la movilidad transplacentaria, la unión al receptor de Fc, La unión del complemento y similares. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de las regiones constantes de las diversas clases de inmunoglobulina son bien conocidas.

5 Las regiones constantes y variables de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas se pliegan en dominios. El término "dominio" se refiere a una región globular de una cadena pesada o ligera que comprende bucles peptídicos (por ejemplo, que comprende de 3 a 4 bucles peptídicos) estabilizados, por ejemplo, por una lámina β plegada y/o un enlace disulfuro intracatenario. Los dominios de la región
10 constante en la cadena ligera de una inmunoglobulina se denominan de manera intercambiable "dominios de la región constante de la cadena ligera", "regiones CL" o "dominios CL". Los dominios constantes de la cadena pesada (por ejemplo, los dominios bisagra, CH1, CH2 o CH3) se denominan de manera intercambiable "dominios de la región constante de la cadena pesada", dominios de la región "CH" o
15 "dominios CH". Los dominios variables de la cadena ligera se denominan de manera intercambiable "dominios de la región variable de la cadena ligera", "regiones variables de la cadena ligera", "dominios de la región VL" o "dominios VL". Los dominios variables de la cadena pesada se denominan de manera intercambiable "dominios de la región variable de la cadena pesada", "regiones variables de la
20 cadena pesada", "dominios de la región VH" o "dominios VH".

Por convención, la numeración de los aminoácidos de los dominios variables de la región constante se incrementa a medida que llegan a ser más distales del sitio de unión a antígeno o del extremo amino-terminal de la inmunoglobulina o el anticuerpo. El extremo N-terminal de cada cadena pesada y ligera de
25 inmunoglobulina es una región variable y el extremo C-terminal es una región constante. Los dominios CH3 y CL comprenden el extremo carboxi-terminal de la cadena pesada y ligera, respectivamente. Por consiguiente, los dominios de una inmunoglobulina de cadena ligera están dispuestos con una orientación VL-CL, mientras que los dominios de la cadena pesada están dispuestos con la orientación
30 VH-CH1-bisagra-CH2-CH3.

La asignación de aminoácidos a cada dominio de la región variable está de acuerdo con las definiciones de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991). Kabat también proporciona una convención para la numeración ampliamente utilizada (numeración
35 de Kabat) en la cual a los restos correspondientes entre diferentes regiones variables de la cadena pesada o entre diferentes regiones variables de la cadena ligera, se

asigna el mismo número. A las CDRs 1, 2 y 3 de un dominio VL también se hace referencia en la presente memoria, respectivamente, como CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 o LCDR1, LCDR2 y LCDR3. A las CDRs 1, 2 y 3 de un dominio VH también se hace referencia en la presente memoria, respectivamente, como CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 o HCDR1, HCDR2 y HCDR3. Si se observa de ese modo, la asignación de CDRs puede estar de acuerdo con IMGT® (Lefranc et al., *Dev Comp Immunol.* (2003) 27:55-77) en lugar de Kabat. La numeración de la región constante de la cadena pesada es mediante el índice Eu, tal y como se expone en Kabat (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991).

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la expresión "dominio VH" incluye el dominio variable amino-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina y la expresión "dominio VL" incluye el dominio variable amino-terminal de una cadena ligera de inmunoglobulina.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la expresión "dominio CH1" incluye el primer dominio de la región constante (el más amino-terminal) de una cadena pesada de inmunoglobulina que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente las posiciones 114-223 en el sistema de numeración de Kabat (posiciones Eu 118-215). El dominio CH1 es adyacente al dominio VH y amino-terminal con respecto a la región bisagra de una molécula de la cadena pesada de inmunoglobulina, y no forma parte de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la expresión "región bisagra" incluye la porción de una molécula de la cadena pesada que une el dominio CH1 con el dominio CH2. La región bisagra comprende aproximadamente 25 restos y es flexible, permitiendo así que las dos regiones N-terminales que se unen al antígeno se muevan independientemente. Las regiones bisagra pueden subdividirse en tres dominios distintos: dominios de bisagra superior, medio e inferior (Roux et al., *J Immunol.* (1998) 161: 4083).

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la expresión "dominio CH2" incluye la porción de una molécula de inmunoglobulina de la cadena pesada que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente las posiciones 244-360 en el sistema de numeración de Kabat (posiciones Eu 231-340). El dominio CH2 es único porque no está estrechamente emparejado con otro dominio. Más bien, dos cadenas de carbohidratos ramificadas enlazadas con N se interponen entre dos dominios CH2 de una molécula IgG natural intacta. En una realización, un polipéptido de unión de

la presente descripción comprende un dominio CH2 obtenido a partir de una molécula de IgG1 (por ejemplo, una molécula de IgG1 humana).

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la expresión "dominio CH3" incluye la porción de una molécula de inmunoglobulina de cadena pesada que se extiende aproximadamente a lo largo de 110 restos desde el extremo N-terminal del dominio CH2, por ejemplo, desde aproximadamente las posiciones 361-476 del sistema de numeración de Kabat (posiciones Eu 341-447). El dominio CH3 forma normalmente la porción C-terminal del anticuerpo. En algunas inmunoglobulinas, sin embargo, dominios adicionales pueden extenderse desde el dominio CH3 para formar la porción C-terminal de la molécula (por ejemplo, el dominio CH4 en la cadena μ de IgM y la cadena ϵ de IgE). En una realización, un polipéptido de unión de la presente descripción comprende un dominio CH3 obtenido a partir de una molécula de IgG1 (por ejemplo, una molécula de IgG1 humana).

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la expresión "dominio CL" incluye el dominio de la región constante de una cadena ligera de inmunoglobulina que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente la posición de Kabat 107A hasta aproximadamente la posición de Kabat 216. El dominio CL es adyacente al dominio VL. En una realización, un polipéptido de unión de la presente descripción comprende un dominio CL obtenido a partir de una cadena ligera kappa (por ejemplo, una cadena ligera kappa humana).

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la expresión "antagonista de FcRn" se refiere a cualquier agente que comprende una región Fc (por ejemplo, una región Fc variante descrita en la presente memoria) que se une específicamente a FcRn a través de la región Fc e inhibe la unión de una inmunoglobulina a FcRn.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "Fc", "dominio Fc", "región Fc" o "fragmento Fc", se utilizan de manera intercambiable y se definen como la porción de una región constante de la cadena pesada que comienza en la región bisagra localizada justo de forma N-terminal del sitio de escisión de papaína (es decir, el resto 216 en IgG, tomando como primer resto de la región constante de la cadena pesada el 114) y que termina en el extremo C-terminal de la cadena pesada. Por consiguiente, un Fc completo, dominio Fc, región Fc o fragmento Fc comprende al menos una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. La alineación de secuencias de porciones (dominios CH2 y CH3, restos 231 a 447, numeración Eu) de dominios Fc de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanos ejemplificantes, se muestra en la FIG. 32. Las expresiones incluyen Fc natural/de tipo silvestre y variantes de Fc, tal y como se describen en la presente memoria e incluyen

moléculas en forma monomérica o multimérica (por ejemplo, dimérica), ya sea digeridas a partir de un anticuerpo completo o producidas por otros medios, tales como tecnología recombinante. Véase, por ejemplo, Ying et al., *JBC* (2013) 288:25154-164; e Yang et al., *JBC* (2019) 294:10638-48. En algunas realizaciones, el Fc modificado de la presente descripción comprende la totalidad o una porción que se une a FcRn de SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, mostrada en la FIG. 32 (o una variante natural de la misma), en donde la secuencia ha sido modificada para incluir las sustituciones de aminoácidos descritas en la presente memoria.

La fuente de inmunoglobulina original del Fc natural es normalmente de origen humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas, tales como IgG1 e IgG2. Las moléculas de Fc naturales están constituidas por polipéptidos monoméricos que pueden unirse en formas diméricas o multiméricas mediante enlaces covalentes (es decir, enlaces disulfuro) y no covalentes. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre las subunidades monoméricas de las moléculas Fc naturales varía de 1 a 4, dependiendo de la clase (por ejemplo, IgG, IgA e IgE) o la subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 e IgA2). Un ejemplo de un Fc natural es un dímero unido por disulfuro que es el resultado de una digestión con papaína de una IgG. La expresión “Fc natural”, según se utiliza en la presente memoria, es genérica para las formas monómera, dimérica y multimérica.

La expresión “variante de Fc”, “Fc modificado”, “dominio Fc modificado”, según se utiliza en la presente memoria, se refiere a una molécula o secuencia que se modifica a partir de un Fc natural/de tipo silvestre, pero todavía comprende un sitio de unión para el FcRn. Una variante de Fc o un dominio Fc modificado también puede ser más corto o más largo que un Fc natural (por ejemplo, más corto o más largo que una secuencia que incluye los restos 216 a 447 de IgG humana, numeración Eu); por ejemplo, la variante de Fc o un Fc modificado puede carecer de ciertos restos de aminoácidos N-terminales y/o C-terminales del Fc natural o puede contener restos aminoacídicos adicionales en el extremo N-terminal y/o C-terminal, en comparación con un Fc natural. El propio dominio Fc modificado no incluye un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo o de una variante de anticuerpo o un dominio de unión a una diana de una inmunoadhesina, pero el dominio Fc modificado puede unirse a un dominio de ese tipo para formar un antagonista de FcRn que se une también a una diana que no es FcRn. La expresión incluye una molécula o secuencia que está humanizada procedente de un Fc natural no humano. Además, un Fc natural comprende regiones que pueden ser eliminadas porque proporcionan características estructurales o actividades biológicas que no son necesarias para los antagonistas

de FcRn (por ejemplo, polipéptidos que se unen a un tipo de anticuerpo) descritos en la presente memoria. De esta manera, la expresión incluye una molécula o secuencia que carece de uno o varios sitios o restos de Fc naturales, o en donde se han modificado uno o varios sitios o restos de Fc, que afectan o están implicados en: (1) la formación de enlaces disulfuro, (2) la incompatibilidad con una célula hospedadora seleccionada, (3) la heterogeneidad N-terminal tras la expresión en una célula hospedadora seleccionada, (4) la glicosilación, (5) la interacción con el complemento, (6) la unión a un receptor de Fc diferente de un receptor de rescate (un FcγR) o (7) la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

Tal y como se ha indicado anteriormente, las regiones variables de un anticuerpo permiten que reconozca selectivamente y se una específicamente a epítopos en los antígenos. Es decir, el dominio VL y el dominio VH de un anticuerpo se combinan para formar la región variable (Fv) que define un sitio de unión a antígeno tridimensional. Esa estructura cuaternaria de anticuerpo forma el sitio de unión a antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión a antígeno se define por tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs), en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y ligera. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la expresión "sitio de unión a antígeno" incluye un sitio que se une específicamente (inmunorreacciona) con un antígeno (por ejemplo, una superficie celular o un antígeno soluble). El sitio de unión a antígeno incluye una cadena pesada de inmunoglobulina y regiones variables de la cadena ligera, y el sitio de unión formado por esas regiones variables determina la especificidad del anticuerpo. Un sitio de unión a antígeno se forma por regiones variables que varían de un anticuerpo a otro. Los polipéptidos de unión que antagonizan a FcRn, tales como los anticuerpos de la presente descripción, comprenden al menos un sitio de unión a antígeno.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión de la descripción actual comprenden al menos dos dominios de unión a antígeno que proporcionan la asociación del polipéptido de unión con el antígeno seleccionado. Los dominios de unión a antígeno no tienen que obtenerse a partir de la misma molécula de inmunoglobulina. A este respecto, la región variable se puede obtener a partir de cualquier tipo de animal que se pueda inducir para establecer una respuesta humoral y generar inmunoglobulinas contra el antígeno deseado. Como tal, la región variable de un polipéptido de unión puede tener, por ejemplo, un origen de mamífero, por ejemplo, puede ser de un ser humano, murino, rata, cabra, oveja, primate no humano

(tal como macacos cinomolgos, macacos rhesus, macacos, etc.), lobo o camélido (por ejemplo, procedente de camellos, llamas y especies relacionadas).

En los anticuerpos que se presentan en la naturaleza, las seis CDRs presentes en cada anticuerpo son secuencias cortas y no contiguas de aminoácidos que se colocan específicamente para formar el sitio de unión a antígeno, a medida
5 que el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un ambiente acuoso. El resto de los dominios variables pesados y ligeros muestran menos variabilidad intermolecular en la secuencia de aminoácidos y se denominan regiones estructurales. Las regiones estructurales adoptan en gran medida una conformación
10 de lámina β y las CDRs forman bucles que conectan y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . De esta manera, esas regiones estructurales actúan para formar un andamio que proporciona el posicionamiento de las seis CDRs con la orientación correcta mediante interacciones no covalentes entre las cadenas. El dominio de unión a antígeno formado por las CDRs posicionadas define una
15 superficie complementaria al epítipo en el antígeno inmunorreactivo. Esa superficie complementaria favorece la unión no covalente del anticuerpo con el epítipo de un antígeno inmunorreactivo.

Los polipéptidos de unión ejemplificantes incluyen variantes de anticuerpos. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la expresión "variante de anticuerpo"
20 incluye formas sintéticas y modificadas genéticamente de anticuerpos que se alteran de tal manera que no se presentan de manera natural, por ejemplo, anticuerpos que comprenden al menos dos porciones de cadena pesada pero no dos cadenas pesadas completas (tales como anticuerpos con un dominio delecionado o minicuerpos); formas multiespecíficas de anticuerpos (por ejemplo, biespecíficas,
25 triespecíficas, etc., alteradas para unirse a dos o más antígenos diferentes o a diferentes epítopos sobre un único antígeno); moléculas de cadena pesada unidas a moléculas de scFv y similares. Además, la expresión "variante de anticuerpo" incluye formas multivalentes de anticuerpos (por ejemplo, trivalentes, tetravalentes, etc., anticuerpos que se unen a tres, cuatro o más copias del mismo antígeno).

30 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "valencia" se refiere al número de sitios potenciales de unión a una diana en un polipéptido. Cada sitio de unión a una diana se une específicamente a una molécula diana o a un sitio específico sobre una molécula diana. Cuando un polipéptido comprende más de un sitio de unión a una diana, cada sitio de unión a una diana puede unirse
35 específicamente a las mismas moléculas o a moléculas diferentes (por ejemplo, puede unirse a diferentes ligandos o a diferentes antígenos o a diferentes epítopos

sobre el mismo antígeno). Los polipéptidos de unión en cuestión tienen normalmente al menos un sitio de unión específico para una molécula de antígeno humano.

El término "especificidad" se refiere a la capacidad de unirse específicamente (por ejemplo, inmunorreaccionando con) un antígeno diana dado (por ejemplo, un antígeno diana humano). Un polipéptido de unión puede ser monoespecífico y contener uno o varios sitios de unión que se unen específicamente a una diana, o un polipéptido puede ser multiespecífico y contener dos o más sitios de unión que se unen específicamente a dianas iguales o diferentes. En ciertas realizaciones, un polipéptido de unión es específico de dos porciones diferentes (por ejemplo, no solapantes) de la misma diana. En ciertas realizaciones, un polipéptido de unión es específico de más de una diana. Polipéptidos de unión a modo de ejemplo (por ejemplo, anticuerpos) que comprenden sitios de unión a antígeno que se unen a antígenos, se conocen en la técnica y se pueden incluir una o varias CDRs de tales anticuerpos en un anticuerpo, tal y como se describe en la presente memoria.

El término "antígeno" o la expresión "antígeno diana", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a una molécula o a una porción de una molécula a la que un polipéptido de unión se puede unir a través del sitio de unión. Un antígeno diana puede tener uno o varios epítomos.

El término "alrededor de" o "aproximadamente" significa dentro de aproximadamente un 20%, tal como dentro de aproximadamente un 10%, dentro de aproximadamente un 5% o dentro de aproximadamente un 1% o menos de un valor o intervalo dado.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "administrar" o "administración" se refiere al acto de inyectar o suministrar físicamente de otra manera una sustancia tal como existe fuera del cuerpo (por ejemplo, un antagonista de FcRn proporcionado en la presente memoria) a un paciente, tal como, pero sin limitarse a, por vía pulmonar (por ejemplo, inhalación), a través de la mucosa (por ejemplo, intranasal), intradérmica, intravenosa, intramuscular, subcutánea y/o cualquier otro método de administración física descrito en la presente memoria o conocido en la técnica. Cuando una enfermedad o un síntoma de la misma, se asiste o se trata, la administración de la sustancia normalmente ocurre después del inicio de la enfermedad o de los síntomas de la misma. Cuando se evita una enfermedad o un síntoma de la misma, la administración de la sustancia normalmente ocurre antes del inicio de la enfermedad o de los síntomas de la misma y se puede continuar a lo largo del tiempo para posponer o reducir el aspecto o la magnitud de los síntomas asociados con la enfermedad.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "composición" se entiende que incluye un producto que contiene los ingredientes especificados (por ejemplo, un antagonista de FcRn proporcionado en la presente memoria) en, opcionalmente, las cantidades especificadas, así como cualquier producto que sea
 5 el resultado, directa o indirectamente, de la combinación de los ingredientes especificados, opcionalmente, en las cantidades especificadas.

"Cantidad eficaz" significa la cantidad de agente farmacéutico activo (por ejemplo, un antagonista de FcRn de la presente descripción) suficiente para conseguir un resultado fisiológico deseado en un individuo que requiere el agente.
 10 La cantidad eficaz puede variar entre los individuos, dependiendo de la salud y el estado físico del individuo que se va a tratar, la formulación de la composición, la evaluación del estado médico del individuo y otros factores relevantes.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, los términos "sujeto" y "paciente" se utilizan de manera intercambiable. Tal y como se utiliza en la presente memoria,
 15 un sujeto es un mamífero tal como un no primate (por ejemplo, ratones, ratas, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, etc.) o un primate (por ejemplo, monos y seres humanos). En realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "terapia" se refiere a cualquier protocolo, método y/o agente que se puede usar en la prevención, control,
 20 tratamiento y/o mejora de una enfermedad o un síntoma relacionado con la misma. En algunas realizaciones, el término "terapia" se refiere a cualquier protocolo, método y/o agente que se puede usar en la modulación de una enfermedad mediada por IgG (por ejemplo, una respuesta autoinmune) o un estado en un sujeto o un síntoma relacionado. En algunas realizaciones, los términos "terapias" y "terapia" se refieren
 25 a una terapia biológica, una terapia de soporte y/u otras terapias útiles en la prevención, control, tratamiento y/o mejora de una enfermedad o un síntoma relacionado con la misma, conocida por un experto en la técnica, como el personal médico. En otras realizaciones, los términos "terapias" y "terapia" se refieren a una terapia biológica, una terapia de soporte y/u otras terapias útiles en la modulación de
 30 una respuesta inmune en un sujeto o un síntoma relacionado, conocida por un experto en la técnica, tal como el personal médico.

Tal y como se utilizan en la presente memoria, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando" se refieren a la reducción o mejora de la progresión, gravedad y/o duración de una enfermedad o un síntoma relacionado con la misma,
 35 que es el resultado de la administración de una o varias terapias (incluyendo, pero sin limitarse a, la administración de uno o varios agentes profilácticos o terapéuticos,

tales como un antagonista de FcRn proporcionado en la presente memoria). El término "tratando", según se utiliza en la presente memoria, puede referirse también a alterar el curso de una enfermedad del sujeto que se está tratando. Los efectos terapéuticos de un tratamiento incluyen, sin limitación, la prevención de la aparición o recurrencia de una enfermedad, el alivio del o de los síntomas, la disminución de las consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, la reducción de la tasa de progresión de una enfermedad, la mejora o alivio del estado de enfermedad y una remisión o un pronóstico mejorado.

Antagonistas de FcRn

Los presentes antagonistas de FcRn comprenden (incluyendo los que consisten o consisten esencialmente en) un dominio Fc modificado y pueden ser, por ejemplo, anticuerpos, variantes de anticuerpo o fragmentos tales como fragmentos Fc, inmunoadhesinas y proteínas de fusión de Fc. Los antagonistas de FcRn pueden comprender un fragmento Fc monomérico o dimérico.

Los dominios Fc de cualquier subtipo de IgG pueden utilizarse para generar un FcRn de la presente descripción. En algunas realizaciones, el Fc modificado se obtiene a partir de un dominio Fc humano de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 y comprende las sustituciones descritas en esta memoria con relación al origen de tipo silvestre. En ciertas otras realizaciones, el Fc modificado es un Fc artificial obtenido a partir de más de un subtipo de IgGs. En otras realizaciones, los dominios Fc comprenden una bisagra quimérica (es decir, una bisagra que comprende porciones de bisagra obtenidas a partir de dominios bisagra de diferentes isotipos de anticuerpos, por ejemplo, un dominio bisagra superior procedente de una molécula de IgG4 y un dominio bisagra central de IgG1).

En ciertas realizaciones, el dominio Fc modificado se obtiene a partir de un dominio Fc de IgG1 humana. En otras realizaciones, el dominio Fc modificado se obtiene a partir de un dominio Fc de IgG4 humana. En el caso de dominios Fc de otros subtipos, el experto en la materia apreciará que cualquiera de las sustituciones de aminoácidos descritas en la presente memoria puede adaptarse en consecuencia (véase la FIG. 32). A menos que se indique de otra manera, las posiciones de los restos de Fc indicadas en la presente memoria, son de acuerdo con el sistema de numeración Eu para Ig. Como se observa en la FIG. 32, los dominios CH2 y CH3 de IgG humana están altamente conservados entre los cuatro subtipos diferentes. El sistema de numeración Eu se aplica a todos los subtipos.

En algunas realizaciones, el dominio Fc modificado puede comprender una sustitución de aminoácidos seleccionada a partir de M252, I253, S254, T256, K288,

T307, K322, E380, L432, N434 o Y436 y cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el dominio Fc modificado puede comprender una sustitución doble de aminoácidos en cualquiera de dos posiciones de aminoácidos seleccionadas a partir de M252, I253, S254, T256, K288, T307, K322, E380, L432, N434 e Y436. En algunas realizaciones, el dominio Fc modificado puede comprender una sustitución triple de aminoácidos en cualquiera de tres posiciones de aminoácidos seleccionadas a partir de M252, I253, S254, T256, K288, T307, K322, E380, L432, N434 e Y436. En algunas realizaciones, el dominio Fc modificado puede comprender una sustitución cuádruple de aminoácidos en cualquiera de cuatro posiciones de aminoácidos seleccionadas a partir de M252, I253, S254, T256, K288, T307, K322, E380, L432, N434 e Y436. En algunas realizaciones, puede ser deseable que un dominio Fc modificado comprenda una sustitución de aminoácidos en cualquiera de las posiciones de aminoácidos seleccionadas a partir de M252, I253, S254, T256, K288, T307, K322, E380, L432 o Y436 y cualquier combinación de las mismas, en donde la posición del aminoácido N434 no está sustituida (es decir, la posición del aminoácido N434 es de tipo silvestre).

En algunas realizaciones, el dominio Fc modificado puede comprender una sustitución de aminoácidos seleccionada a partir de M252Y (es decir, una tirosina en la posición del aminoácido 252), T256D, T256E, K288D, K288N, T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q, T307W, E380C, N434F, N434P, N434Y, Y436H, Y436N o Y436W y cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el dominio Fc modificado puede comprender una sustitución doble de aminoácidos seleccionada a partir de M252, en donde la sustitución es M252Y; T256, en donde la sustitución es T256D o T256E; K288, en donde la sustitución es K288D o K288N; T307, en donde la sustitución es T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q o T307W; E380, en donde la sustitución es E380C; N434, en donde la sustitución es N434F, N434P o N434Y; Y436, en donde la sustitución es Y436H, Y436N o Y436W. En algunas realizaciones, el dominio Fc modificado puede comprender una sustitución triple de aminoácidos seleccionada a partir de M252, en donde la sustitución es M252Y; T256, en donde la sustitución es T256D o T256E; K288, en donde la sustitución es K288D o K288N; T307, en donde la sustitución es T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q o T307W; E380, en donde la sustitución es E380C; N434, en donde la sustitución es N434F, N434P o N434Y; Y436, en donde la sustitución es Y436H, Y436N o Y436W. En algunas realizaciones, el dominio Fc modificado puede comprender una sustitución de aminoácidos cuádruple seleccionada a partir de M252, en donde la sustitución es M252Y; T256, en donde la sustitución es T256D o T256E; K288, en donde la

sustitución es K288D o K288N; T307, en donde la sustitución es T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q o T307W; E380, en donde la sustitución es E380C; N434, en donde la sustitución es N434F, N434P o N434Y; Y436, en donde la sustitución es Y436H, Y436N o Y436W. En algunas realizaciones, puede ser deseable que un dominio Fc modificado comprenda una sustitución de aminoácidos en cualquiera de las posiciones de aminoácidos seleccionadas a partir de M252Y, T256D, T256E, K288D, K288N, T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q, T307W, E380C, Y436H, Y436N o Y436W y cualquier combinación de las mismas, en donde la posición del aminoácido N434 no se sustituye con una fenilalanina (F) o una tirosina (Y). En algunas realizaciones, puede ser deseable que un dominio Fc modificado comprenda una sustitución de aminoácidos en cualquiera de las posiciones de aminoácidos seleccionadas a partir de M252Y, T256D, T256E, K288D, K288N, T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q, T307W, E380C, Y436H, Y436N o Y436W y cualquier combinación de las mismas, en donde la posición del aminoácido N434 no se sustituye con una tirosina (Y). En algunas realizaciones, puede ser deseable que un dominio Fc modificado comprenda una sustitución de aminoácidos en cualquiera de las posiciones de aminoácidos seleccionadas a partir de M252Y, T256D, T256E, K288D, K288N, T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q, T307W, E380C, Y436H, Y436N o Y436W y cualquier combinación de las mismas, en donde la posición del aminoácido N434 no está sustituida (es decir, la posición del aminoácido N434 es de tipo silvestre).

En ciertas realizaciones, el dominio Fc modificado puede comprender una sustitución de aminoácidos seleccionada a partir de M252, T256, T307 o N434 y cualquier combinación de las mismas. En ciertas realizaciones, el dominio Fc modificado puede comprender una sustitución doble de aminoácidos en cualquiera de las dos posiciones de aminoácidos seleccionadas a partir de M252, T256, T307 y N434. En ciertas realizaciones, el dominio Fc modificado puede comprender una sustitución triple de aminoácidos en cualquiera de las tres posiciones de aminoácidos seleccionadas a partir de M252, T256, T307 y N434. En ciertas realizaciones, el dominio Fc modificado puede comprender una sustitución cuádruple de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos M252, T256, T307 y N434. En algunas realizaciones, puede ser deseable que un dominio Fc modificado comprenda una sustitución de aminoácidos seleccionada a partir de M252, T256 o T307 y cualquier combinación de las mismas, en donde la posición del aminoácido N434 no está sustituida (es decir, la posición del aminoácido N434 es de tipo silvestre).

En realizaciones ejemplificantes, el dominio Fc modificado puede comprender

una sustitución de aminoácidos seleccionada a partir de M252, en donde la sustitución es M252Y; T256, en donde la sustitución es T256D o T256E; T307, en donde la sustitución es T307Q o T307W; o N434, en donde la sustitución es N434F o N434Y y cualquier combinación de las mismas. En ciertas realizaciones, el dominio

5 Fc modificado puede comprender una sustitución doble de aminoácidos en cualquiera de las dos posiciones de aminoácidos seleccionadas a partir de M252, en donde la sustitución es M252Y; T256, en donde la sustitución es T256D o T256E; T307, en donde la sustitución es T307Q o T307W; o N434, en donde la sustitución es N34F o N434Y. En ciertas realizaciones, el dominio Fc modificado puede

10 comprender una sustitución triple de aminoácidos en cualquiera de las tres posiciones de aminoácidos seleccionadas a partir de M252, en donde la sustitución es M252Y; T256, en donde la sustitución es T256D o T256E; T307, en donde la sustitución es T307Q o T307W; o N434, en donde la sustitución es N34F o N434Y. En ciertas realizaciones, el dominio Fc modificado puede comprender una sustitución

15 cuádruple de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos seleccionadas a partir de M252, en donde la sustitución es M252Y; T256, en donde la sustitución es T256D o T256E; T307, en donde la sustitución es T307Q o T307W; o N434, en donde la sustitución es N34F o N434Y. En algunas realizaciones, puede ser deseable que un dominio Fc modificado comprenda una sustitución de aminoácidos seleccionada a

20 partir de M252Y, T256D, T256E, T307Q o T307W y cualquier combinación de las mismas, en donde la posición del aminoácido N434 no se sustituye con una fenilalanina (F) o una tirosina (Y). En algunas realizaciones, puede ser deseable que un dominio Fc modificado comprenda una sustitución de aminoácidos seleccionada a partir de M252Y, T256D, T256E, T307Q o T307W y cualquier combinación de las

25 mismas, en donde la posición del aminoácido N434 no está sustituida con una tirosina (Y). En algunas realizaciones, puede ser deseable que un dominio Fc modificado comprenda una sustitución de aminoácidos seleccionada a partir de M252Y, T256D, T256E, T307Q o T307W y cualquier combinación de las mismas, en donde la posición del aminoácido N434 no está sustituida (es decir, la posición del aminoácido

30 N434 es de tipo silvestre).

En ciertas realizaciones, el dominio Fc modificado puede comprender una sustitución de aminoácidos seleccionada a partir de T256D o T256E y/o T307W o T307Q y además puede comprender una sustitución de aminoácidos seleccionada a partir de N434F o N434Y o M252Y. En algunas realizaciones, puede ser deseable

35 que un dominio Fc modificado comprenda una sustitución de aminoácidos seleccionada a partir de T256D o T256E y/o T307W o T307Q y además comprender

la sustitución del aminoácido M252Y, en donde la posición del aminoácido N434 no está sustituida con una fenilalanina (F) o una tirosina (Y). En algunas realizaciones, puede ser deseable que un dominio Fc modificado comprenda una sustitución de aminoácidos seleccionada a partir de T256D o T256E y/o T307W o T307Q y además
 5 comprenda la sustitución de aminoácidos M252Y, en donde la posición del aminoácido N434 no se sustituye con una tirosina (Y). En algunas realizaciones, puede ser deseable que un dominio Fc modificado comprenda una sustitución de aminoácidos seleccionada a partir de T256D o T256E y/o T307W o T307Q y además comprenda la sustitución de aminoácidos M252Y, en donde la posición del
 10 aminoácido N434 no está sustituida (es decir, la posición del aminoácido N434 es de tipo silvestre).

En algunas realizaciones, el dominio Fc modificado puede comprender las sustituciones de aminoácidos mostradas en la FIG. 33, por ejemplo, el dominio Fc modificado puede comprender sustituciones dobles de aminoácidos M252Y/N434Y
 15 (YY); o sustituciones triples de aminoácidos, seleccionadas a partir de M252Y/T307W/N434Y (YWY), M252Y/T256D/N434Y (YDY) y T256D/307W/N434Y (DWY).

En algunas realizaciones, el dominio Fc modificado puede comprender una sustitución cuádruple de aminoácidos seleccionada a partir de
 20 M252Y/T256D/T307Q/N434F (YDQF), M252Y/T256D/T307W/N434F (YDWF), M252Y/T256D/T307Q/N434Y (YDQY), M252Y/T256E/T307Q/N434Y (YEQY), M252Y/T256D/T307W/N434Y (YDWY) y M252Y/T256E/T307W/N434Y (YEWY).

En algunas realizaciones, el dominio Fc modificado tiene una o varias, por ejemplo, dos o más, tres o más o cuatro o más, sustituciones de aminoácidos, tal y
 25 como se describe en la presente memoria.

El Fc modificado tiene afinidades de unión hacia FcRn mejoradas a pH ácido (por ejemplo, menos de aproximadamente 7,0, no más de aproximadamente 6,5 o no más de aproximadamente 6,0) y a pH no ácido (por ejemplo, no menor de aproximadamente 7,0 o no menor de aproximadamente 7,4), en comparación con su
 30 homólogo de tipo silvestre.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término “mejorado” se refiere a un incremento del 10% de un parámetro dado y puede incluir al menos un incremento del 20%, incremento del 30%, incremento del 40%, incremento del 50%, incremento del 60%, incremento del 70%, incremento del 80%, incremento del 90%,
 35 incremento del 95%, incremento del 97%, del 99% o incluso un incremento del 100% sobre el control, línea de referencia o valor anterior. El término “mejorado” puede

referirse a al aumento de al menos 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 1000 veces de un parámetro determinado sobre el control, línea de referencia o valor anterior. En determinadas realizaciones, el término

5 "mejorado" se refiere a un aumento en relación con un patrón de tipo silvestre, por ejemplo, un dominio Fc de tipo silvestre. En otras realizaciones, el término "mejorado" se refiere a un incremento en relación con un antagonista de FcRn, por ejemplo, un antagonista de FcRn que comprende M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F ("YTEKF hlgG1"; véase, por ejemplo, Swiercz et al., *supra*).

10 En algunas realizaciones, el antagonista de FcRn puede mostrar una afinidad de unión a FcRn específica de especie. En algunas realizaciones, el antagonista de FcRn puede mostrar una afinidad de unión a FcRn humano así como a FcRn de cinomolgo. En una realización, un polipéptido de unión puede mostrar una afinidad de unión a FcRn de rata y/o ratón. En algunas realizaciones, un polipéptido de unión

15 puede mostrar afinidad de unión a FcRn de especies cruzadas. Esos polipéptidos de unión se dice que tienen una reactividad cruzada con una o varias especies diferentes. En una realización, un polipéptido de unión puede mostrar afinidad de unión tanto hacia FcRn humano como de rata.

El receptor de Fc neonatal (FcRn) interacciona con la región Fc de los

20 anticuerpos para favorecer el reciclado a través del rescate desde una degradación lisosómica normal. Ese proceso es un proceso dependiente del pH que se produce en los endosomas a pH ácido (por ejemplo, un pH inferior a 6,5) pero no en las condiciones fisiológicas de pH de la corriente sanguínea (por ejemplo, un pH no ácido). El antagonista de FcRn de la presente descripción tiene una afinidad de unión

25 hacia FcRn mejorada o una tasa de disociación de FcRn más lenta tanto en condiciones ácidas como no ácidas, en comparación con un polipéptido que comprende un dominio Fc de tipo silvestre. Un pH ácido es un pH menor de aproximadamente 7,0, por ejemplo, aproximadamente pH 6,5, aproximadamente pH 6,0, aproximadamente pH 5,5, aproximadamente pH 5,0. Un pH elevado, no ácido,

30 es un pH de aproximadamente 7 o mayor, tal como aproximadamente pH 7,4, aproximadamente pH 7,6, aproximadamente pH 7,8, aproximadamente pH 8,0, aproximadamente pH 8,5 o aproximadamente pH 9,0. En ciertas realizaciones, el polipéptido que comprende un dominio Fc modificado descrito en la presente memoria, presenta una pérdida de la dependencia del pH en la unión a FcRn; es

35 decir, a diferencia del Fc de tipo silvestre, el polipéptido no tiene una afinidad de unión drásticamente menor a FcRn en condiciones no ácidas, en comparación con las

condiciones ácidas. Tales polipéptidos son por lo tanto útiles como antagonistas de FcRn para favorecer el aclaramiento de IgGs con propiedades de unión a FcRn de tipo silvestre desde la circulación, debido a que los antagonistas de FcRn, al unirse fuertemente a FcRn de una manera independiente del pH o menos dependiente del pH, interrumpen el reciclado mediado por FcRn de las IgGs que tienen afinidad de unión hacia FcRn de tipo silvestre (es decir, menor).

Los dominios Fc de las inmunoglobulinas están implicados en funciones de unión a no antígenos y tienen varias funciones efectoras mediadas por la unión a los receptores de Fc, por ejemplo, la unión del FcRn. Tal y como se ilustra en la FIG. 1A, los dominios Fc están constituidos por un dominio CH2 y un dominio CH3. Una mayoría de los restos de Fc implicados en la interacción con FcRn se localizan en los bucles directamente adyacentes a la interfaz CH2-CH3 (FIG. 1A, línea punteada) y opuestos al sitio de glicosilación. La FIG. 1B ilustra la representación superficial de la estructura cristalina de IgG1 Fc (pdb: 5d4q) y muestra los restos en los dominios CH2 y CH3 que comprenden la interfaz de unión a FcRn.

En ciertas realizaciones, el presente antagonista de FcRn puede comprender un dominio Fc modificado que comprende una o varias mutaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) que alteran las funciones efectoras (por ejemplo, la función ADCC o CDC) del dominio Fc, en comparación con una molécula de tipo silvestre correspondiente, por ejemplo, una molécula que tiene la misma estructura que el antagonista de FcRn excepto que tiene un dominio Fc de tipo silvestre. Para un anticuerpo antagonista de FcRn, su molécula de tipo silvestre correspondiente puede ser un anticuerpo completo, no alterado, que incluye un anticuerpo con aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, un antagonista de FcRn que tiene una función efectora reducida de ADCC y/o CDC (por ejemplo, aquellos que contienen las mutaciones LALA) puede ser menos probable que provoque efectos secundarios no deseados cuando se administra a los pacientes.

En ciertas realizaciones, el presente antagonista de FcRn puede comprender un dominio Fc modificado que comprende una o varias mutaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) que alteran (por ejemplo, aumentan o disminuyen) la semivida en circulación (por ejemplo, semivida en suero) del antagonista de FcRn, en comparación con la molécula de tipo silvestre correspondiente. Por ejemplo, una disminución en la semivida en suero puede ser ventajosa cuando no se desea que el antagonista de FcRn esté presente en el cuerpo del paciente durante un período de tiempo prolongado.

En ciertas realizaciones, el presente antagonista de FcRn puede comprender

un dominio Fc modificado que comprende una o varias mutaciones (por ejemplo, sustituciones) que proporcionan una o varias características bioquímicas deseadas, tales como la capacidad de permanecer monomérico, la capacidad para dimerizarse no covalentemente, una capacidad incrementada para localizar un sitio diana y patrones de glicosilación, en comparación con la molécula de tipo silvestre correspondiente. Por ejemplo, el dominio Fc modificado puede tener una glicosilación reducida (por ejemplo, una glicosilación ligada a N o a O). Las sustituciones de aminoácidos ejemplificantes que confieren una glicosilación reducida o alterada se describen en el documento de Publicación PCT Internacional nº WO 2005/018572.

En algunas realizaciones, el dominio Fc se modifica para eliminar la glicosilación (por ejemplo, los anticuerpos “agly”). Un antagonista de FcRn “agly” puede tener un perfil mejorado de seguridad y estabilidad *in vivo*. Están disponibles numerosos métodos reconocidos en la técnica para la obtención de anticuerpos “agly” o anticuerpos con glicanos alterados. Por ejemplo, se pueden usar células hospedadoras modificadas genéticamente (por ejemplo, levadura modificada, por ejemplo, *Picchia* o células CHO) con rutas de glicosilación modificadas (por ejemplo, deleciones de glicosil-transferasas) para producir tales anticuerpos.

En ciertas realizaciones, el dominio Fc se puede mutar para disminuir la función efectora utilizando métodos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el Fc modificado de la presente memoria tiene también una afinidad de unión alterada hacia los receptores gamma de Fc (FcγR). Los FcγRs pertenecen a una familia que incluye varios miembros, por ejemplo, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcγRIIIb. En algunas realizaciones, el Fc modificado de la presente memoria, aunque tiene afinidades de unión a FcRn mejoradas, tiene una afinidad de unión a FcγRIIIa reducida, en comparación con un dominio Fc de tipo silvestre.

En algunas realizaciones, los antagonistas de FcRn son anticuerpos. Los anticuerpos adecuados incluyen sin limitación, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos y pueden ser anticuerpos de longitud completa o anticuerpos de cadena sencilla. Los anticuerpos pueden dirigirse a dianas solubles (por ejemplo, citocinas y proteínas circulantes secretadas) asociadas con un estado de enfermedad.

Las proteínas, que incluyen anticuerpos, con una estabilidad termodinámica baja tienen una propensión incrementada para un plegamiento defectuoso y agregación y limitarían o impedirían la actividad, la eficacia y el potencial de la proteína como un agente terapéutico útil. En ciertas realizaciones, el antagonista de FcRn tiene aproximadamente la misma estabilidad térmica o es comparable a la de

un polipéptido que comprende un dominio Fc de tipo silvestre o un dominio Fc modificado que tiene las sustituciones triples de los aminoácidos M252Y/S254T/T256E (YTE).

El perfil fisiológico resultante, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las modificaciones, tales como la localización, biodistribución y semivida en suero, se pueden medir y cuantificar fácilmente utilizando técnicas inmunológicas bien conocidas sin una experimentación excesiva.

En ciertas realizaciones, el antagonista de FcRn de la presente descripción es un polipéptido de unión aislado y comprende un fragmento que se une a antígeno obtenido a partir de un anticuerpo, fusionado con el dominio Fc modificado. La expresión “fragmento que se une a antígeno” se refiere a un fragmento polipeptídico de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une a un antígeno o compite con un anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto a partir del cual se ha obtenido) para la unión al antígeno (es decir, unión específica).

En algunas realizaciones, el polipéptido de unión comprende una secuencia de la región variable de cadena sencilla (ScFv) fusionada con un Fc modificado de la presente memoria. Las secuencias de regiones variables de cadena sencilla comprenden un solo polipéptido que tiene uno o varios sitios de unión al antígeno, por ejemplo, un dominio VL unido por un enlazador flexible a un dominio VH. Las moléculas de ScFv se pueden construir con una orientación VH-enlazador-VL o una orientación VL-enlazador-VH. La bisagra flexible que enlaza los dominios VL y VH que constituyen el sitio de unión al antígeno, incluye desde aproximadamente 10 a aproximadamente 50 restos de aminoácidos. Los péptidos enlazadores son conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, un polipéptido de unión de la presente descripción es un anticuerpo multivalente (por ejemplo, tetravalente) que se produce fusionando una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo con una molécula de ScFv (por ejemplo, una molécula de ScFv alterada). Por ejemplo, en una realización, esas secuencias se combinan de manera que la molécula de ScFv (por ejemplo, una molécula de ScFv alterada) se une por su extremo N-terminal o C-terminal a un fragmento Fc de un anticuerpo mediante un enlazador flexible (por ejemplo, un enlazador gly/ser). En otra realización, se puede preparar un anticuerpo tetravalente de la presente descripción, fusionando una molécula de ScFv con un péptido enlazador, que se fusiona con un dominio Fc modificado para construir una molécula tetravalente ScFv-Fab.

En otra realización, un polipéptido de unión de la presente descripción es un

minicuerpo alterado. Un minicuerpo alterado de la presente descripción es una molécula dimérica constituida por dos cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales comprende una molécula de ScFv que se fusiona con un dominio Fc modificado, por medio de un péptido enlazador. Los minicuerpos se pueden preparar construyendo un componente de ScFv y conectando los componentes peptídicos utilizando los métodos descritos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento de patente de los EE.UU. nº 5.837.821 o WO 94/09817). En otra realización, se puede construir un minicuerpo tetravalente. Los minicuerpos tetravalentes pueden construirse de la misma manera que los minicuerpos, excepto que dos moléculas de ScFv se enlazan utilizando un enlazador flexible. La estructura artificial scFv-scFv unida se liga entonces a un dominio Fc modificado.

En otra realización, un polipéptido de unión de la presente descripción comprende un diacuerpo. Los diacuerpos son moléculas diméricas, tetravalentes, en donde cada una de las cuales tiene un polipéptido similar a las moléculas de scFv, pero teniendo usualmente un enlazador corto con restos de aminoácidos (menos de 10, por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 5) que conecta ambos dominios variables, de manera que los dominios VL y VH en la misma cadena del polipéptido no pueden interaccionar. En su lugar, el dominio VL y VH de una cadena polipeptídica interaccionan con el dominio VH y VL (respectivamente) sobre una segunda cadena polipeptídica (véase, por ejemplo, el documento WO 02/02781). Los diacuerpos de la presente descripción comprenden una molécula similar a scFv fusionada con un dominio Fc modificado.

En otras realizaciones, los polipéptidos de unión comprenden anticuerpos multi-específicos o multivalentes que comprenden uno o varios dominios variables en serie, sobre la misma cadena de polipéptido, por ejemplo, polipéptidos con dominio variable en tándem (TVD). Los polipéptidos TVD ejemplificantes incluyen la configuración de “doble cabeza” o “Fv doble” descrita en el documento de patente de los EE.UU. nº 5.989.830. En la configuración de Fv doble, los dominios variables de dos anticuerpos diferentes se expresan con una orientación en tándem en dos cadenas distintas (una cadena pesada y una cadena ligera), en donde una cadena polipeptídica tiene dos dominios VH en serie separados por un enlazador peptídico (VH1-enlazador-VH2) y la otra cadena polipeptídica consiste en dominios VL complementarios conectados en serie con un enlazador peptídico (VL1-enlazador-VL2). En la configuración de doble cabeza cruzada, los dominios variables de dos anticuerpos diferentes se expresan en una orientación en tándem sobre dos cadenas polipeptídicas distintas (una cadena pesada y una cadena ligera), en donde una

cadena polipeptídica tiene dos dominios VH en serie, separados por un enlazador peptídico (VH1-enlazador-VH2) y la otra cadena polipeptídica consiste en dominios VL complementarios conectados en serie por un enlazador peptídico con la orientación opuesta (VL2-enlazador-VL1). Variantes de anticuerpos adicionales
 5 basadas en el formato “Fv doble”, incluyen el anticuerpo biespecífico de IgG de dominio variable doble (DVD-IgG) (véase el documento de patente de los EE.UU. nº 7.612.181 y el formato TBTI (véase el documento US 2010/0226923 A1). En algunas realizaciones, los polipéptidos de unión comprenden anticuerpos multi-específicos o multivalentes que comprenden uno o varios dominios variables en serie en la misma
 10 cadena polipeptídica, fusionados con un dominio Fc modificado.

En otra realización ejemplificante, el polipéptido de unión comprende un anticuerpo biespecífico de IgG de dominio variable doble (CODV-IgG) basado en una configuración de “doble cabeza” (véase el documento US20120251541 A1).

En otra realización ejemplificante, el polipéptido de unión es una
 15 inmunoadhesina. Tal y como se utiliza en la presente memoria, una “inmunoadhesina” se refiere a un polipéptido de unión que comprende uno o varios dominios de unión (por ejemplo, procedentes de un receptor, un ligando o una molécula de adhesión celular) enlazado con un dominio constante de inmunoglobulina (es decir, una región Fc) (véase, por ejemplo, Ashkenazi et al.,
 20 *Methods* (1995) 8(2):104-15 e Isaacs, *Brit J Rheum.* (1997) 36:305-7, que se incorporan en esta memoria como referencia en su totalidad). Un ejemplo de inmunoadhesinas es una molécula quimérica entre un dominio de unión a ligando de un receptor y un dominio Fc de IgG. En algunas realizaciones, los antagonistas de FcRn son inmunoadhesinas que se unen a y secuestran citocinas involucradas en la
 25 inflamación.

Las inmunoadhesinas se identifican por el sufijo “-cept” en sus nombres internacionales de no propiedad (DCI). Como los anticuerpos, las inmunoadhesinas tienen semividas circulantes largas, se purifican fácilmente por métodos basados en la afinidad y tienen ventajas de avidéz conferida por la bivalencia. Ejemplos de
 30 inmunoadhesinas terapéuticas disponibles en el mercado incluyen etanercept (ENBREL®), abatacept (ORENCIA®), rilonacept (ARCALYST®), aflibercept (ZALTRAP® / EYLEA®) y belatacept (NULOJIX®).

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión aislados son imitadores de anticuerpos, tales como aficuerpos, afillinas, afímeros, afitinas, alfacuerpos,
 35 anticalinas, avímeros, DARPin, finómeros, péptidos de dominio Kunitz, monocuerpos y nano-CLAMPs, fusionados con los dominios Fc modificados

descritos en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, el polipéptido de unión comprende dominios similares a inmunoglobulinas. Los dominios similares a inmunoglobulinas adecuados incluyen, sin limitación, dominios de fibronectina (véase, por ejemplo, Koide et al., *Methods Mol Biol.* (2007) 352: 95-109, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad), DARPin (véase, por ejemplo, Stumpp et al., *Drug Discov Today* (2008) 13 (15-16):695-701, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad), dominios Z de proteína A (véase, Nygren et al., *FEBS J.* (2008) 275(11): 2668-76, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad), lipocalinas (véase, por ejemplo, Skerra et al., (2008) *FEBS J.* 275(11): 2677-83, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad), afilinas (véase, por ejemplo, Ebersbach et al., *J Mol Biol.* (2007) 372(1):172-85, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad), afitinas (véase, por ejemplo, Krehenbrink et al., (2008) *J Mol Biol.* 383 (5):1058–68, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad), avímeros (véase, por ejemplo, Silverman et al., (2005) *Nat Biotechnol.* 23(12):1556–61, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad), finómeros (véase, por ejemplo, Grabulovski et al., *J Biol Chem.* (2007) 282(5):3196–3204, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad) y péptidos del dominio Kunitz (véase, por ejemplo, Nixon et al., (2006) *Curr Opin Drug Discov Devel* 9 (2):261–8, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad).

Un polipéptido de unión de la presente descripción, que comprende un dominio Fc modificado descrito en la presente memoria, puede incluir las secuencias de CDRs o las secuencias de dominio variable de un anticuerpo de unión “original” conocido. En algunas realizaciones, el anticuerpo original y el anticuerpo de la descripción pueden compartir secuencias similares o idénticas, excepto por modificaciones en el dominio Fc, tal y como se describe en la presente memoria.

Ácidos nucleicos y vectores de expresión

Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos descritos en la presente memoria se insertan normalmente en un vector de expresión para su introducción en células hospedadoras que se pueden usar para producir la cantidad deseada de los polipéptidos descritos, tales como anticuerpos, fragmentos de los mismos o inmunoadhesinas. Por consiguiente, en ciertos aspectos, la invención proporciona vectores de expresión que comprenden polinucleótidos descritos en la presente memoria y células hospedadoras que comprenden esos vectores y polinucleótidos.

El término "vector" o la expresión "vector de expresión" que se utiliza en la presente memoria, para los fines de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se entiende que significa vectores utilizados para introducir y expresar un gen deseado en una célula. Esos vectores se pueden seleccionar fácilmente a partir del grupo que
5 consiste en plásmidos, fagos y virus (por ejemplo, baculovirus, virus vaccinia, lentivirus, adenovirus, virus adenoasociados y retrovirus). En general, un vector comprenderá un marcador de selección y sitios de restricción apropiados para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad del vector para entrar y/o replicarse en células eucariotas o procariotas.

10 Se pueden emplear numerosos sistemas de vectores de expresión. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de ADN que se obtienen a partir de virus animales, tales como el virus de papiloma bovino, virus de polioma, adenovirus, virus vaccinia, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistrónicos con sitios de unión al ribosoma internos.
15 Adicionalmente, las células que han integrado el ADN en sus cromosomas se pueden seleccionar introduciendo uno o varios marcadores que permiten la selección de las células hospedadoras transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofia a un hospedador auxotrófico, resistencia a biocidas (por ejemplo, antibióticos) o resistencia a metales pesados tales como el cobre. El gen marcador seleccionable
20 puede estar unido directamente a las secuencias de ADN que se van a expresar o se introduce en la misma célula mediante cotransformación. También pueden ser necesarios elementos adicionales para una síntesis óptima del ARNm. Esos elementos pueden incluir secuencias señal, señales de corte y empalme, así como promotores de la transcripción, potenciadores y señales de terminación. En algunas
25 realizaciones, los genes clonados de la región variable se insertan en un vector de expresión junto con los genes de la región constante de la cadena pesada y ligera (tales como genes humanos) sintetizados como se ha descrito anteriormente.

En otras realizaciones, un polipéptido de unión tal y como se describe en la presente memoria, puede expresarse utilizando estructuras artificiales
30 policistrónicas. En tales sistemas de expresión, se pueden producir múltiples productos génicos de interés tales como cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos a partir de una sola estructura artificial policistrónica. Esos sistemas utilizan ventajosamente un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para proporcionar niveles de polipéptidos relativamente altos en las células hospedadoras eucariotas.
35 Las secuencias de IRES compatibles se describen en el documento de patente de EE.UU. nº 6.193.980.

Más generalmente, una vez que se ha preparado un vector o una secuencia de ADN que codifica un antagonista de FcRn de la presente descripción, el vector de expresión se puede introducir en una célula hospedadora apropiada. La introducción del plásmido en la célula hospedadora puede llevarse a cabo mediante diversas técnicas tales como transfección (incluyendo electroforesis y electroporación), fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio, fusión celular con ADN encapsulado, microinyección e infección con un virus intacto. Las células transformadas se cultivan en condiciones apropiadas para la producción de los presentes polipéptidos de unión y se analizan para su síntesis. Las técnicas de ensayo ejemplificantes incluyen el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o análisis para la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

Las células hospedadoras utilizadas para la expresión del presente polipéptido pueden ser de origen eucariota (por ejemplo, mamífero, insecto, levadura o planta) o procariota. En algunas realizaciones, la línea de células hospedadoras utilizada para la expresión del polipéptido tiene origen mamífero; los expertos en la técnica pueden determinar líneas de células hospedadoras particulares que son las más adecuadas para el producto génico deseado que se va a expresar en la misma. Las líneas de células hospedadoras ejemplificantes incluyen, pero no se limitan a, células de ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo DG44 y DUXB11, líneas CHO, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno T de SV40), R1610 (fibroblasto de hámster chino) BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano) y 293 (riñón humano). En una realización, la línea celular proporciona una glicosilación alterada, por ejemplo, una afucosilación, de los polipéptidos de unión (por ejemplo, anticuerpos) expresados a partir de las mismas (por ejemplo, las líneas celulares PER.C6.RTM. (Crucell) o CHO con FUT8 desactivado (células POTELLIGENT™) (Biowa, Princeton, NJ)). En una realización, se pueden utilizar células NS0. Las líneas de células hospedadoras están normalmente disponibles a partir de servicios comerciales, de la "American Tissue Culture Collection" o a partir de artículos publicados. Las técnicas para el cultivo de células de mamífero en condiciones de cultivo tisular son conocidas en la técnica e incluyen el cultivo homogéneo en suspensión, por ejemplo, en un reactor con elevación de aire o en un reactor con agitación continua, o el cultivo de células inmovilizadas o atrapadas, por ejemplo, en fibras huecas, microcápsulas, en

microperlas de agarosa o cartuchos de cerámica. Si es necesario y/o se desea, las soluciones de polipéptidos se pueden purificar mediante métodos de cromatografía habituales, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa y/o cromatografía por (inmuno-) afinidad.

5 **Métodos de tratamiento**

En un aspecto, la presente descripción proporciona métodos para tratar a un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) que lo requiere, que comprenden administrar una cantidad eficaz de un antagonista de FcRn descrito en la presente memoria. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona artículos de
10 manufactura (por ejemplo, kits) para utilizar en tales métodos de tratamiento. El paciente tiene una enfermedad o un trastorno mediado por IgG y se beneficiará de un aclaramiento más rápido de las IgGs séricas, al ser tratado con el antagonista de FcRn de la presente descripción. Tal y como se utiliza en la presente memoria, las expresiones trastorno, afección o enfermedad "relacionada con anticuerpos",
15 "mediada con anticuerpos" y "que responde a anticuerpos", se refieren a un trastorno, afección o enfermedad que se puede mejorar eliminando un anticuerpo no deseado (por ejemplo, cierta IgG autorreactiva o IgG terapéutica o de diagnóstico proporcionada exógenamente, que ya no es necesaria o beneficiosa para el paciente).

20 En ciertas realizaciones, el trastorno mediado por IgG puede ser, una enfermedad autoinmune tal como la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD), lupus eritematoso sistémico (SLE), miastenia grave, esclerosis sistémica (SSc)/esclerodermia, artritis reumatoide, artritis psoriática, osteoartritis, diabetes, esclerosis múltiple, pénfigo vulgar, dermatitis atópica, psoriasis, asma, alergia,
25 fibrosis pulmonar idiopática (IPF), púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) e hidradenitis supurativa.

En ciertas realizaciones, el trastorno mediado por IgG puede ser una alergia. La alergia puede ser, por ejemplo, una alergia a los alimentos (por ejemplo, alergia al huevo, alergia al pescado, alergia al marisco, alergia a la fruta, alergia al ajo, alergia
30 al pimiento picante, alergia a la avena, alergia a la carne, alergia a la leche, alergia al cacahuete, alergia al arroz, alergia al ajonjolí, alergia a la soja, alergia al sulfito, alergia a la tartrazina, alergia a la nuez de árbol, alergia al trigo y similares), alergia a un fármaco (por ejemplo, alergia a la tetraciclina, alergia a la dilantina, alergia al tegretol, alergia a la penicilina, alergia a la cefalosporina, alergia a la sulfonamida,
35 alergia a anti-inflamatorios no esteroideos, alergia al colorante de contraste intravenoso y similares), una alergia ambiental (por ejemplo, alergia a la hierba,

alergia al polen, alergia a los gatos, alergia a los perros, alergia a insectos, alergia al moho, alergia al perfume, alergia cosmética, alergia al semen, alergia al látex, alergia al agua, alergia al polvo doméstico, alergia al níquel, alergia al oro, alergia al cromo, alergia al cloruro de cobalto, alergia al revelador fotográfico, alergia al fungicida y
5 similares) y una alergia por contacto (por ejemplo, alergia al látex, alergia a la parafenilendiamina, alergia al monotioglicolato de glicerilo, alergia al formaldehído de toluensulfanomida y similares).

En ciertas realizaciones, los antagonistas de FcRn descritos en la presente memoria pueden utilizarse en combinación con uno o varios agentes terapéuticos
10 adicionales. En ciertas realizaciones, una terapia de combinación que comprende un antagonista de FcRn descrito en la presente memoria se puede dirigir a una diana del sistema inmune innato y/o del sistema inmune adaptativo, por ejemplo, uniéndose y eliminando de la circulación las citocinas proinflamatorias. En algunas realizaciones, los propios antagonistas de FcRn pueden unirse y eliminar las citocinas
15 proinflamatorias, logrando los efectos combinados de eliminar IgG sérica autorreactiva, así como citocinas pro-inflamatorias. En ciertas realizaciones, una terapia de combinación que comprende un antagonista de FcRn descrito en la presente memoria, puede incluir un inhibidor de TLR, por ejemplo, un inhibidor de IRAK-4.

En ciertas realizaciones, los antagonistas de FcRn pueden usarse para reducir los niveles séricos de un agente que contiene Fc (por ejemplo, un agente terapéutico o de diagnóstico) en un sujeto. El aclaramiento de un agente que contiene Fc puede ser deseado en casos en los que el agente que contiene Fc es perjudicial (por ejemplo, estóxico) para un sujeto o cuando se desea que el reactivo que contiene
25 Fc esté presente en un sujeto durante un cierto período de tiempo, por ejemplo, cuando el agente que contiene Fc es inmunogénico o cuando el agente que contiene Fc es un conjugado de anticuerpo-fármaco, respectivamente. En ciertas realizaciones, el aclaramiento de un agente que contiene Fc reduce la cantidad de la exposición del sujeto al agente que contiene Fc. El nivel de cualquier agente que
30 contiene Fc en el suero se puede reducir empleando un antagonista de FcRn descrito en la presente memoria. En consecuencia, en ciertas realizaciones, un antagonista de FcRn descrito en la presente memoria se utiliza para reducir los niveles en suero de un agente que contiene Fc en un sujeto al que se ha administrado al agente que contiene Fc.

En otro aspecto, se proporciona un método para mejorar la formación de
35 imágenes para diagnóstico, el cual comprende administrar a un sujeto una cantidad

terapéuticamente eficaz de un antagonista de FcRn descrito en la presente memoria. Los antagonistas de FcRn descritos en la presente memoria pueden utilizarse para reducir tanto los niveles del ruido de fondo, como la exposición sistémica a un anticuerpo radiomarcado durante la obtención de imágenes para diagnóstico. En
5 ciertas realizaciones, la formación de imágenes para diagnóstico incluye, sin limitación, tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT), una combinación de PET y tomografía computarizada (CT) y similares.

En ciertas realizaciones, se administra a un sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo radiomarcado y opcionalmente, se administra un antagonista de FcRn
10 después de la administración del anticuerpo radiomarcado. En ciertas realizaciones, el contraste del anticuerpo radiomarcado mejora en un sujeto utilizando los antagonistas de FcRn descritos en la presente memoria, por ejemplo, eliminando de la circulación los anticuerpos radiomarcados no unidos, permitiendo un mayor
15 contraste (por ejemplo, señales de fondo reducidas) y una reducción de los efectos perjudiciales de la exposición a anticuerpos radiomarcados. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, se proporciona un método para reducir la exposición de tejido normal a un anticuerpo radiomarcado durante la formación de imágenes para diagnóstico, el cual comprende administrar a un sujeto una cantidad
20 terapéuticamente eficaz de un antagonista de FcRn descrito en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, los antagonistas de FcRn descritos en la presente memoria pueden utilizarse para aclarar un agente terapéutico de un sujeto. Por ejemplo, un sujeto al que se administra un agente terapéutico puede desarrollar anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos anti-fármaco, que reducen la disponibilidad y/o
25 la eficacia del agente terapéutico administrado. La presencia de anticuerpos anti-fármaco en un sujeto puede dar como resultado efectos secundarios no deseados. Por consiguiente, los antagonistas de FcRn descritos en la presente memoria eliminan los anticuerpos anti-fármaco que se desarrollan en un sujeto.

Mediante una experimentación de rutina, el experto en la técnica será capaz
30 de determinar una cantidad eficaz de un antagonista de FcRn tal y como se describe en la presente memoria (por ejemplo, una variante cuádruple con unión mejorada a FcRn a pH 6,0 y pH 7,4). En ciertas realizaciones, una cantidad eficaz de un antagonista de FcRn no es tóxica. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de FcRn puede variar de acuerdo con diversos factores. Por ejemplo, sin
35 limitación, la edad, el sexo, el estadio de la enfermedad y el historial médico de un sujeto al que se va a administrar un antagonista de FcRn, pueden afectar a la

determinación adecuada de una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista de FcRn. Se puede determinar un régimen de dosificación adecuado para proporcionar una respuesta terapéutica eficaz en un sujeto. Las dosificaciones pueden dividirse y administrarse durante un cierto período de tiempo, por ejemplo, administrarse
5 diariamente durante una semana.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona kits y métodos para el diagnóstico y/o el tratamiento de trastornos, por ejemplo, un trastorno mediado por IgG en un sujeto mamífero que requiere ese tratamiento. En realizaciones ejemplificantes, el sujeto es un ser humano.

10 **Composiciones farmacéuticas y administración de las mismas**

Los métodos para preparar y administrar los presentes antagonistas de FcRn a un sujeto, son bien conocidos o pueden ser fácilmente determinados por los expertos en la técnica. La vía de administración puede ser oral, parenteral, tópica o por inhalación. El término "parenteral", tal y como se utiliza en la presente memoria,
15 incluye una administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Aunque todas esas formas de administración se contemplan claramente dentro del alcance de la presente descripción, una forma de administración sería una solución para la inyección, en particular para la inyección o el goteo intravenoso o intraarterial. Usualmente, una composición farmacéutica
20 adecuada para inyección puede comprender un tampón (por ejemplo, de acetato, histidina, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato), opcionalmente un agente estabilizante (por ejemplo, albúmina humana), un conservante, etc. En algunas realizaciones, el antagonista de FcRn puede ser administrado directamente en el sitio de una población celular adversa, aumentando así la exposición del tejido
25 enfermo al agente terapéutico.

Las preparaciones para una administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los
30 vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios tamponados. En las composiciones y los métodos de la presente descripción, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, 0,01-0,1 M, por ejemplo, tampón fosfato 0,05 M o solución salina al 0,8%. Otros vehículos
35 parenterales comunes incluyen soluciones de fosfato sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos

intravenosos incluyen abastecedores de fluidos y nutrientes, abastecedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. También pueden estar presentes agentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y gases inertes y similares. Más particularmente, las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersiones. En tales casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida para que se pueda inyectar fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y normalmente estará protegida contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de agentes tensioactivos.

Una prevención de la acción de los microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, se incluirán agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Una absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo al incluir en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En cualquier caso, se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando un compuesto activo (por ejemplo, el propio polipéptido de unión modificado o en combinación con otros agentes activos) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado, con un ingrediente o una combinación de los ingredientes enumerados en la presente memoria, según se requiera, seguido de una esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación ejemplificantes incluyen secado al vacío y liofilización, que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución de los mismos previamente esterilizada. Las preparaciones

para inyecciones se procesan, se rellenan en recipientes tales como ampollas, bolsas, botellas, jeringas o viales y se sellan en condiciones asépticas de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Además, las preparaciones se pueden envasar y vender en forma de un kit. Tales artículos de fabricación normalmente tendrán
5 etiquetas o prospectos que indican que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que padece o tiene una predisposición a trastornos mediados por IgG.

Las dosis eficaces de las presentes composiciones farmacéuticas varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio diana, estado de salud del paciente, historial médico, edad, sexo y peso. Las
10 dosificaciones del tratamiento pueden ser valoradas utilizando métodos de rutina conocidos por los expertos en la técnica para optimizar la seguridad y la eficacia.

Los presentes antagonistas de FcRn pueden administrarse en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosificaciones aisladas pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares tal y como se
15 indica midiendo los niveles sanguíneos de IgG en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de antagonista de FcRn en plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml y en algunos métodos aproximadamente 25-300 µg/ml. Alternativamente, el antagonista de FcRn puede administrarse como
20 una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. Para los anticuerpos, la dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente.

Una composición farmacéutica en la presente memoria puede comprender una o varias especies de los presentes antagonistas de FcRn y un vehículo estéril, no tóxico, farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina fisiológica, tampones no tóxicos y similares. La dosificación y la frecuencia de la administración
25 pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas que contienen un antagonista de FcRn o una mezcla de los mismos, se administran a un paciente que todavía no está afectado por la enfermedad para mejorar la resistencia del paciente frente al desarrollo de una enfermedad (por ejemplo, un paciente genéticamente susceptible). Esa cantidad se define como una “dosis eficaz profiláctica”. En ese uso, las cantidades precisas dependen de nuevo del estado de salud del paciente y de la
30 inmunidad general, pero generalmente varían de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 mg por dosis, especialmente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,5 mg por dosis. Se administra una dosificación relativamente
35

baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo el tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, se requiere a veces una dosificación relativamente alta (por ejemplo, de aproximadamente 1 a 400 mg/kg de anticuerpo por dosis, tal como dosificaciones de aproximadamente 5 a 25 mg) a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina, o hasta que el paciente muestra una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A continuación, se puede administrar al paciente un régimen profiláctico.

Realizaciones ejemplificantes

10 A continuación se proporcionan realizaciones ejemplificantes y no limitantes de la presente descripción.

1. Un método para tratar un trastorno mediado por anticuerpos en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de FcRn que comprende un dominio Fc modificado, en donde el dominio Fc modificado comprende una combinación de al menos cuatro sustituciones de aminoácidos que comprenden:

un ácido aspártico (D) o un ácido glutámico (E) en la posición del aminoácido 256 y un triptófano (W) o una glutamina (Q) en la posición del aminoácido 307, en donde la posición del aminoácido 254 no es treonina (T) y que comprende adicionalmente:

una fenilalanina (F) o una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 434; y una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 252,

en donde las posiciones de los aminoácidos son de acuerdo con la numeración EU.

2. Un método para tratar un trastorno mediado por anticuerpos en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de FcRn que comprende un dominio Fc modificado que tiene una combinación de sustituciones de aminoácidos en las posiciones seleccionadas a partir del grupo que consiste en:

a) una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 252, un ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 256, una glutamina (Q) en la posición del aminoácido 307 y una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 434;

b) una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 252, un ácido glutámico (E) en la posición del aminoácido 256, un triptófano (W) en la posición del aminoácido 307 y una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 434;

35 c) una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 252, un ácido glutámico (E) en la posición del aminoácido 256, una glutamina (Q) en la posición del aminoácido

307 y una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 434;

d) una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 252, un ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 256, una glutamina (Q) en la posición del aminoácido 307 y una fenilalanina (F) en la posición del aminoácido 434; o

5 e) una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 252, un ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 256, un triptófano (W) en la posición del aminoácido 307 y una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 434, en donde las sustituciones de aminoácidos son de acuerdo con la numeración EU.

3. Un método para tratar un trastorno mediado por anticuerpos en un sujeto
10 que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de FcRn que comprende un dominio Fc modificado que comprende: una sustitución cuádruple de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en M252Y/T256D/T307Q/N434Y, M252Y/T256E/T307W/N434Y, M252Y/T256E/T307Q/N434Y, M252Y/T256D/T307Q/N434F y M252Y/T256D/T307W/N434Y, en
15 donde las sustituciones de aminoácidos son de acuerdo con la numeración EU.

4. Un método para tratar un trastorno mediado por anticuerpos en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de FcRn que comprende un dominio Fc modificado que comprende una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 252, un ácido aspártico (D)
20 en la posición del aminoácido 256, una glutamina (Q) en la posición del aminoácido 307 y una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 434, de acuerdo con la numeración EU.

5. Un método para tratar un trastorno mediado por anticuerpos en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente
25 eficaz de un antagonista de FcRn que comprende un dominio Fc modificado que comprende una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 252, un ácido glutámico (E) en la posición del aminoácido 256, un triptófano (W) en la posición del aminoácido 307 y una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 434, de acuerdo con la numeración EU.

30 6. Un método para tratar un trastorno mediado por anticuerpos en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de FcRn que comprende un dominio Fc modificado que comprende una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 252, un ácido glutámico (E) en la posición del aminoácido 256, una glutamina (Q) en la posición del aminoácido
35 307 y una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 434, de acuerdo con la numeración EU.

7. Un método para tratar un trastorno mediado por anticuerpos en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de FcRn que comprende un dominio Fc modificado que comprende una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 252, un ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 256, una glutamina (Q) en la posición del aminoácido 307 y una fenilalanina (F) en la posición del aminoácido 434, de acuerdo con la numeración EU.

8. Un método para tratar un trastorno mediado por anticuerpos en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de FcRn que comprende un dominio Fc modificado que comprende una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 252, un ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 256, un triptófano (W) en la posición del aminoácido 307 y una tirosina (Y) en la posición del aminoácido 434, de acuerdo con la numeración EU.

9. El método de cualquier realización precedente, en donde el dominio Fc modificado es un dominio Fc humano modificado.

10. El método de cualquier realización precedente, en donde el dominio Fc modificado es un dominio Fc modificado de IgG1.

11. El método de cualquier realización precedente, en donde el antagonista de FcRn tiene afinidad de unión a FcRn humano.

12. El método de cualquier realización precedente, en donde el antagonista de FcRn tiene afinidad de unión a FcRn humano y de rata.

13. El método de cualquier realización precedente, en donde el antagonista de FcRn tiene afinidad de unión a FcRn mejorada, en comparación con un antagonista de FcRn que comprende un dominio Fc de tipo silvestre.

14. El método de cualquier realización precedente, en donde el antagonista de FcRn tiene afinidad de unión a FcRn mejorada a pH ácido, en comparación con un antagonista de FcRn que comprende un dominio Fc de tipo silvestre.

15. El método de cualquier realización precedente, en donde el antagonista de FcRn tiene afinidad de unión a FcRn mejorada a pH ácido, en comparación con un antagonista de FcRn que comprende M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, de acuerdo con la numeración EU.

16. El método de cualquier realización precedente, en donde el antagonista de FcRn tiene afinidad de unión a FcRn mejorada a pH no ácido, en comparación con un antagonista de FcRn que comprende un dominio Fc de tipo silvestre.

17. El método de cualquier realización precedente, en donde el antagonista

de FcRn tiene afinidad de unión a FcRn mejorada a pH no ácido, en comparación con un antagonista de FcRn que comprende M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, de acuerdo con la numeración EU.

18. El método de cualquier realización precedente, en donde el antagonista de FcRn tiene afinidad de unión a FcRn mejorada a pH ácido y afinidad de unión a FcRn mejorada a pH no ácido, en comparación con un antagonista de FcRn que comprende un dominio Fc de tipo silvestre.

19. El método de cualquier realización precedente, en donde el antagonista de FcRn tiene afinidad de unión a FcRn mejorada a pH ácido y afinidad de unión a FcRn mejorada a pH no ácido, en comparación con un antagonista de FcRn que comprende M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, de acuerdo con la numeración EU.

20. El método de cualquier realización precedente, en donde el pH ácido es de aproximadamente 6,0.

21. El método de cualquier realización precedente, en donde el pH no ácido es de aproximadamente 7,4.

22. El Método de cualquier realización precedente, en donde el antagonista de FcRn tiene una semivida en suero reducida, en comparación con un antagonista de FcRn que comprende un dominio Fc de tipo silvestre.

23. El método de cualquier realización precedente, en donde el antagonista de FcRn tiene una semivida en suero reducida, en comparación con un antagonista de FcRn que comprende M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, de acuerdo con la numeración EU.

24. El método de cualquier realización precedente, en donde el antagonista de FcRn tiene afinidad de unión a FcγRIIIa reducida, en comparación con un antagonista de FcRn que comprende un dominio Fc de tipo silvestre.

25. El método de cualquier realización precedente, en donde el antagonista de FcRn tiene una estabilidad térmica reducida, en comparación con un antagonista de FcRn que comprende un dominio Fc de tipo silvestre.

26. El método de cualquier realización precedente, en donde el antagonista de FcRn es un polipéptido de unión.

27. El método de cualquier realización precedente, en donde el antagonista de FcRn es un anticuerpo o un fragmento del mismo seleccionado a partir del grupo que consiste en un fragmento Fv, un anticuerpo de cadena sencilla (ScFv), un Fab, un Fab-H, un Fab', un F(ab')₂, un Fd, un dAb y una versión multimérica de los mismos, un anticuerpo de un solo dominio, un maxicuerpo, un minicuerpo, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, un vNAR y un bis-scFv.

28. El método de cualquier realización precedente, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

29. El método de cualquier realización precedente, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.

5 30. El método de cualquier realización precedente, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.

31. El método de una cualquiera de las realizaciones 1-25, en donde el antagonista de FcRn es un mimético de anticuerpo seleccionado a partir del grupo que consiste en un aficuerpo, una afilina, un afímero, una afitina, un alfacuerpo, una
10 anticalina, un avímero, un DARPin, un finómero, un péptido de dominio Kunitz, un monocuerpo y un nano-CLAMP.

32. El método de la realización 31, en donde el antagonista de FcRn es un aficuerpo.

33. El método de cualquier realización precedente, en donde el antagonista
15 de FcRn comprende además un dominio de unión a albúmina.

34. El método de cualquier realización precedente, en donde el antagonista de FcRn se une específicamente a una o varias dianas.

35. El método de cualquier realización precedente, en donde el trastorno mediado por anticuerpos es una enfermedad autoinmune.

20 36. El método de la realización 35, en donde la enfermedad autoinmune se selecciona a partir del grupo que consiste en enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD), lupus eritematoso sistémico (SLE), miastenia grave, esclerosis sistémica (SSc)/esclerodermia, artritis reumatoide, artritis psoriática, osteoartritis, diabetes, esclerosis múltiple, pénfigo vulgar, dermatitis atópica, psoriasis, asma,
25 alergia, fibrosis pulmonar idiopática (IPF), púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) e hidradenitis supurativa.

37. Un método para mejorar la formación de imágenes para diagnóstico que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de FcRn que comprende un dominio Fc modificado que comprende una
30 sustitución cuádruple de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en M252Y/T256D/T307Q/N434Y, M252Y/T256E/T307W/N434Y, M252Y/T256E/T307Q/N434Y, M252Y/T256D/T307Q/N434F y M252Y/T256D/T307W/N434Y, en donde las sustituciones de aminoácidos son de acuerdo con la numeración EU.

38. El método de la realización 37, que comprende además administrar al
35 sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo radiomarcado.

39. El método de la realización 38, en donde el antagonista de FcRn se

administra después del anticuerpo radiomarcado.

40. El método de la realización 37 o 38, en donde el método mejora el contraste para el anticuerpo radiomarcado.

41. Un método para reducir la exposición de un tejido no diana a un anticuerpo radiomarcado durante la formación de imágenes para diagnóstico, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de FcRn que comprende un dominio Fc modificado que comprende: una sustitución cuádruple de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en M252Y/T256D/T307Q/N434Y, M252Y/T256E/T307W/N434Y, M252Y/T256E/T307Q/N434Y, M252Y/T256D/T307Q/N434F y M252Y/T256D/T307W/N434Y, en donde las sustituciones de aminoácidos son de acuerdo con la numeración EU.

El contenido de los artículos, documentos de patentes y solicitudes de patente y todos los demás documentos e información disponible electrónicamente mencionada o citada en la presente memoria, se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad, como si cada publicación individual estuviera específica e individualmente indicada para ser incorporada como referencia. Los solicitantes se reservan el derecho de incorporar físicamente en esta solicitud cualquiera y todos los materiales e información procedente de cualquiera de esos artículos, patentes, solicitudes de patente u otros documentos físicos y electrónicos.

Aunque la presente invención se ha descrito haciendo referencia a las realizaciones específicas de la misma, los expertos en la técnica entenderán que se pueden hacer diversos cambios y se pueden sustituir equivalentes sin apartarse del verdadero espíritu y alcance de la invención. Será claramente evidente para los expertos en la materia que pueden hacerse otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos descritos en la presente memoria, utilizando equivalentes adecuados sin apartarse del alcance de las realizaciones descritas en la presente memoria. Además, se pueden realizar muchas modificaciones para adaptar una situación particular, material, composición de materia, procedimiento, etapa o etapas del procedimiento, al objetivo, espíritu y alcance de la presente invención. Todas esas modificaciones se entiende que están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Habiendo descrito ahora detalladamente ciertas realizaciones, las mismas se entenderán más claramente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen solo con fines ilustrativos y no se pretende que sean limitativos.

EJEMPLOS

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. No se deben considerar como limitaciones adicionales.

Ejemplo 1: Materiales y Métodos

Reactivos de proteínas

Las siguientes proteínas se expresaron y se aislaron: antígeno con un marcador C-terminal de 8xHistidina (SEQ ID NO: 5); FcRn de rata (rFcRn, UniProt: P1359, subunidad p51: restos 23-298; UniProt: P07151, β 2-m: restos 21-119); FcRn de cinomolgo biotinilado (cyno FcRn, UniProt: Q8SPV9, subunidad p51: restos 24-297 con un marcador Avi C-terminal; UniProt: Q8SPW0, β 2-m: restos 21-119); FcRn humano biotinilado (hFcRn, UniProt: P55899, subunidad p51: restos 24-297 con un marcador Avi C-terminal; UniProt: P61769, β 2-m: restos 21-119); CD16a humano (UniProt: P08637, Fc γ RIIIa: restos 17-208 con un marcador HPC4 C-terminal y valina en la posición 158 (V158)). Las variantes de la cadena pesada H435A y H310A/H435Q se obtuvieron a partir de medios condicionados HEK293. Las variantes mAb2 (IgG1) se clonaron mediante Evitria y se purificaron a partir de una suspensión de medios condicionados CHO K1 utilizando columnas de afinidad mAbSelect™ SuRe™ (GE Healthcare) y tampón reemplazado con solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4 para los experimentos subsiguientes.

Construcción del banco por saturación

Las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos WT IgG1 mAb1 (IgG1) con secuencias de ADN líder, se incorporaron en los plásmidos de expresión en mamífero pBH6414 y pBH6368, respectivamente, utilizando los sitios de enzimas de restricción NcoI y HindIII. El banco por saturación se creó con el kit “Lightning Site Directed Mutagenesis Kit” (Agilent) y los cebadores NNK (N = A/C/G/T, K = G/T) y WWC (W = A/T) (IDT Technologies) para introducir todos los posibles aminoácidos en las siguientes posiciones: M252, I253, S254, T256, K288, T307, K322, E380, L432, N434 e Y436 (numeración Eu). Las secuencias de ADN de la cadena pesada de las tres variantes de control en la estructura principal de mAb1, AAA (T307A/E380A/N434A), LS (M428L/N434S) e YTE (M252Y/S254T/T256E), se construyeron en el vector pBH6414 mediante LakePharma.

El banco de combinación por saturación se obtuvo a través de una mutagénesis dirigida al sitio de la cadena pesada de mAb1 con el kit de mutagénesis Q5 (NEBiolabs) y los cebadores de T256D, T256E, T307Q, T307W, N434F y N434Y con los moldes WT y M252Y en la reacción de PCR. La incorporación de una mutación en la estructura principal de mAb3 se realizó utilizando el kit de mutagénesis de Q5® (NEBiolabs) con los cebadores de M252Y, T256D, T307Q y T307W. La creación de todas las variantes de Fc se confirmó mediante una secuenciación de Sanger (Genewiz, Inc.).

Expresión y purificación de anticuerpos recombinantes

Para la selección desde los medios condicionados, ADN que contenía la cadena pesada mutante y la cadena ligera de tipo silvestre de mAb1, se transfectó en 1 mL de células de mamífero Expi293 (Invitrogen™) para expresión de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron a 37°C, dióxido de carbono al 5% y 80% de humedad con agitación de 900 rotaciones por minuto (RPM) en una placa de 96 pocillos de 2 mL (Greiner Bio-One) y se sellaron con una membrana con orificios de ventilación. Los medios condicionados se recogieron cinco días después de la transfección y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Las variantes iniciales en las estructuras principales de mAb1 y mAb3 se expresaban en una escala de 30 mL en matraces de 125 mL con tapas con ventilación de 0,2 µm (Corning). Los matraces de cultivo de 125 mL se agitaron a 125 RPM durante toda la duración de la expresión. Los medios condicionados se recogieron cinco días después de la transfección y se filtraron a través de filtros cónicos de 0,22 µm, 50 mL (Corning) y se almacenaron a 4°C hasta la purificación.

El aislamiento de mAb1 y mAb3 se realizó utilizando columnas de 1 mL de mAbSelect™ SuRe™ HiTrap® (GE Healthcare). Después de una etapa de lavado con PBS a pH 7,4 con diez volúmenes de columna, los anticuerpos eluyeron con cinco volúmenes de columna de ácido cítrico 0,1 M, pH 3,0 (Sigma) y se neutralizaron con 0,5 mL de tris-base 1 M pH 9,0 (Sigma). En los anticuerpos eluidos se cambió el tampón por a PBS a pH 7,4 y se concentraron hasta $>1 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizando concentradores de Amicon® de 30 kDa MWCO (Millipore®) para los estudios subsiguientes. La concentración de los anticuerpos purificados se determinó a partir de su absorbancia UV a 280 nm (UV₂₈₀) con un coeficiente de extinción apropiado.

Selección y análisis de los medios condicionados con Octet

La selección de los medios condicionados que contenían las variantes mAb1, se realizó en un Octet QK 384 con biosensores Ni-NTA (PALL Life Sciences). El antígeno marcado con His se capturó en 15 µg mL^{-1} durante 300 s in PBS, seroalbúmina bovina al 0,1% (BSA, Sigma) y Tween-20 al 0,01% (Sigma) pH 7,4 (PBST-BSA 7,4) seguido de un lavado durante 20 s con PBST-BSA pH 7,4. Los anticuerpos se capturaron durante 200s en medios condicionados diluidos 1:1 con PBST-BSA pH 7,4. Después de las etapas de lavado con tampón a pH 6,0, la cinética de unión a FcRn se obtuvo utilizando rFcRn 200 nM para tiempos de asociación y disociación de 150 y 200 segundos, respectivamente, a pH 6,0. En todas las etapas durante la selección con Octet, la temperatura era de 30°C con una tasa de agitación de 1000 RPM. Los perfiles cinéticos de unión a rFcRn se corrigieron al inicio de la

fase de asociación de FcRn y se diseñaron para un modelo de unión 1:1, utilizando el programa informático de análisis Octet 7.1.

Cinéticas de unión a FcRn

Se midieron las cinéticas de unión a FcRn en condiciones de pHs múltiples (pH 6,0, 7,4, 8,0 y 9,0) utilizando un aparato Biacore™ T200 (GE Healthcare), utilizando el kit de CAPture con biotina (GE Healthcare) (véase, por ejemplo, Abdiche et al., *MAbs* (2015) 7: 331-43; Karlsson et al., *Anal Biochem* (2016) 502: 53-63). El reactivo de CAPture se capturaba con el chip CAP hasta una densidad superficial de >1500 UR, seguido por FcRn durante un tiempo de captura variable a 30 mL min⁻¹, para tener en cuenta las afinidades de unión reducidas con pH más alto. Las concentraciones de FcRn y los tiempos de captura para cada pH eran los siguientes: pH 6,0: 0,1 mg mL⁻¹ de FcRn durante 24 segundos, pH 7,4 y 8,0: 1 mg mL⁻¹ durante 60 segundos y pH 9,0: 10 mg mL⁻¹ durante 60 segundos. Los tampones de ejecución para todas las condiciones de pH eran Bis-Tris-Propano 20 mM; NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05% con el pH ajustado de acuerdo con pH 6,0, 7,4, 8,0 y 9,0. Se estableció una serie de concentraciones de cada variante de anticuerpo partiendo de 1000 nM en una dilución triple para incluir un amplio intervalo de afinidades de unión. Las mediciones cinéticas se realizaron durante los tiempos de asociación y disociación de 180 segundos y 360 segundos, respectivamente, con una posterior regeneración de la superficie de CAP con clorhidrato de guanidina e hidróxido de sodio cada ciclo. Se obtuvieron mediciones de UR en estado estacionario a pH 7,4, 8,0 y 9,0 con 1000 nM por triplicado. Los sensogramas de cada pH se ajustaron a un modelo de unión 1:1 o bivalente, utilizando el programa informático de evaluación de Biacore™ T200. El modelo bivalente tiene en cuenta los efectos de avidéz observados con niveles elevados de captura de FcRn y los dos sitios de unión a FcRn para cada IgG. Véase, por ejemplo, Suzuki et al., *J Immunol.* (2010) 184:1968-76. Cada serie de concentraciones se ajustaba independientemente para obtener las tasas de asociación y disociación promedio y las afinidades de unión. La unión residual se determinó a partir de la respuesta de unión en estado estacionario antes del inicio de la fase de disociación y se promedió.

Cromatografía por afinidad a FcRn

En un experimento, la columna de afinidad a FcRn se creó a partir de protocolos adaptados de Schlothauer et al., *mAbs* (2013) 5: 576-86. Una columna de 1 mL de estreptavidina HP Hrap® (GE Healthcare) se equilibró con tampón de unión (fosfato de sodio 20 mM (Sigma) pH 7,4, cloruro de sodio 150 mM (NaCl; Sigma)) a 1 mL min⁻¹ para cinco volúmenes de columna, seguido por una inyección de 4

miligramos de cyno FcRn biotinilado. La columna se lavó con tampón de unión y se almacenó a 4°C hasta su uso.

La columna de afinidad a FcRn se equilibró con tampón a pH bajo (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico 20 mM (MES; Sigma) pH 5,5; NaCl 150 mM) para cinco volúmenes de columna, antes de la inyección de 300 µg de cada anticuerpo. Los pHs de las soluciones de anticuerpo se ajustaron a pH 5,5 con tampón a pH bajo. Después de un lavado con diez volúmenes de columna con tampón a pH bajo, los anticuerpos eluyeron con un gradiente de pH lineal con tampón a pH alto (1,3-bis(tris(hidroximetil)metilamino)propano 20 mM (bis tris propano; Sigma) pH 9,5; NaCl 150 mM) con 30 volúmenes de columna a 1 mL min⁻¹ en fracciones de 1 mL y supervisando la UV₂₈₀. La columna de afinidad a FcRn se reequilibró con diez volúmenes de columna de tampón a pH bajo para los experimentos subsiguientes o tampón de unión para el almacenamiento. Todas las variantes se realizaron por triplicado.

El perfil de elución de la columna de afinidad a FcRn para cada variante se diseñó para una única distribución gaussiana, utilizando la Ecuación 1 en Sigmaplot 11 (Systat Software, Inc) para determinar el volumen de elución con un máximo de UV₂₈₀:

$$UV_{280} = y_0 + a \cdot \exp \frac{-(x-x_0)^2}{2b} \quad (\text{Ecuación 1})$$

en donde x_0 es el volumen de elución en el pico máximo con UV₂₈₀, e y_0 es la absorbancia UV₂₈₀ de la línea de referencia, y a y b están relacionados con la anchura total en la mitad de la distribución máxima. El pH de cada fracción se midió con un medidor de pH de Corning Pinnacle 540 y se correlacionó con el volumen de elución utilizando una regresión lineal.

En otro experimento, la columna de afinidad a FcRn se adaptó a partir de Schlothauer et al., *supra* con hFcRn biotinilado en una columna de 1 mL de estreptavidina HP HiTrap® (GE Healthcare). En la columna se inyectaron 300 µg de cada anticuerpo en tampón a pH bajo (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico 20 mM (MES; Sigma) pH 5,5; NaCl 150 mM) en un AKTA Pure System (AKTA). Los anticuerpos eluyeron mediante un gradiente lineal de pH, creado con tampón a pH bajo y alto (1,3-bis(tris(hidroximetil)metilamino)propano 20 mM (bis tris propano; Sigma) pH 9,5; NaCl 150 mM) con 30 volúmenes de columna a 0,5 mL min⁻¹ y vigilando la absorbancia y el pH. La columna se reequilibró con tampón a pH bajo para los experimentos subsiguientes. Todas las variantes se realizaron por triplicado. Los perfiles de elución desde la columna de afinidad a FcRn se ajustaron a una única

distribución Gaussiana en Sigmaplot 11 (Systat Software, Inc.) para determinar el volumen de elución y el pH desde el máximo de UV₂₈₀.

Fluorimetría de barrido diferencial

Los experimentos de fluorimetría de barrido diferencial (DSF) se realizaron en un ciclador térmico de sistema de tiempo real BioRad CFX96™ (BioRad) con reacciones de 20 µL. Se diluyeron las muestras de anticuerpo y el material de reserva 5000x de colorante Sypro™ Orange (Invitrogen™) hasta 0,4 mg mL⁻¹ y 10x, respectivamente, en PBS a pH 7,4. Los anticuerpos y el Sypro™ Orange se mezclaron en una relación 1:1 en placas de PCR de 96 pocillos y se sellaron con adhesivo microseal® (BioRad) hasta tener concentraciones finales de 0,2 mg mL⁻¹ de cada anticuerpo y 5x colorante Sypro™ Orange. Todas las variantes de anticuerpos se realizaron por triplicado. El programa del termociclador consistía en una etapa de equilibrado de 2 minutos a 20°C seguido por una tasa constante de aumento de temperatura de 0,5°C/5 segundos hasta una temperatura final de 100°C. Las mediciones de la fluorescencia de cada pocillo se adquirieron utilizando los detectores de longitud de onda de excitación FAM (485 nm) y de emisión ROX (625 nm) adecuados para la fluorescencia de Sypro™ Orange (véase, por ejemplo, Biggar et al., *Biotechniques* (2012) 53: 231-38). El perfil de intensidad de la fluorescencia DSF y el primer derivado se exportaron desde el administrador BioRad CFX™ y se analizaron en Sigmaplot 11. La T_m se definió como el punto medio de la primera transición en el perfil de intensidad de la fluorescencia.

Cinéticas de unión a FcγRIIIa

Las cinéticas de unión y la afinidad se midieron utilizando un instrumento Biacore™ T200 (GE Healthcare) (Zhou et al., *Biotechnol Bioeng.* (2008) 99:652-65). El anticuerpo anti-HPC4 (Roche), a 50 µg mL⁻¹ en acetato a pH 4,5, se acopló a la superficie del chip sensor CM5 durante 600 segundos a 10 µl min⁻¹ con la química de amina hasta tener una densidad final de >20.000 UR. El tampón de ejecución para los experimentos de cinética de unión a FcγRIIIa era solución salina tamponada con HEPES con tensioactivo P-20 al 0,05% (HBS-P+, GE Healthcare) y cloruro de calcio 2 mM (CaCl₂, Fluka) a pH 7,4. Cada rastro de la cinética se inició con la captura de 1,25 µg mL⁻¹ de FcγRIIIa-V158 marcado con HPC4, durante 30 s a 5 µl min⁻¹. Las cinéticas de asociación y de disociación con 300 nM de cada variante, se midieron para cada variante durante 120-180 segundos para cada etapa a 5 µl min⁻¹. Después de la finalización de las mediciones cinéticas, el chip CM5 se regeneró con tampón HBS-P+ complementado con EDTA 10 mM (Ambion®). Antes de las siguientes mediciones cinéticas, el chip CM5 se lavó durante 120 segundos con HBS-P + con

CaCl₂.

En un experimento, los experimentos cinéticos de FcγRIIIa se analizaron de una manera similar a la descrita para la unión a FcRn a pH 7,4. Para el WT, la referencia, las variantes iniciales y por combinación, las cinéticas en una serie de dilución triple en serie desde 1000 nM, se obtuvieron para determinar la afinidad de la unión a FcγRIIIa. Se determinaron las UR en estado estacionario para cada concentración y replicado, se realizaron gráficos como una función de la concentración del anticuerpo y se ajustaron a un modelo de estado estacionario como se muestra en la Ecuación 2:

$$UR = \text{desplazamiento} + \frac{(R_{\text{máx}} - \text{desplazamiento}) * [\text{Anticuerpo}]}{[\text{Anticuerpo}] + K_{D,app}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

en donde el desplazamiento es la UR de la línea de referencia con anticuerpo 0 nM, $R_{\text{máx}}$ es la meseta de UR con concentraciones elevadas de anticuerpo, $[\text{Anticuerpo}]$ es la concentración de anticuerpo y $K_{D,app}$ es la afinidad de la unión aparente de la interacción entre las variantes y FcγRIIIa.

En otro experimento, los experimentos cinéticos de FcγRIIIa se analizaron de manera similar a la descrita para la unión a FcRn a pH 7,4, utilizando la respuesta de unión en estado estacionario promedio. Para todas las variantes, la UR en estado estacionario con anticuerpo 300 nM, se determinó por triplicado y se promedió. El número de veces de cambio en el cambio de respuesta en relación con WT (número de veces de cambio de respuesta) se determinó para comparar entre las variantes en cada estructura principal.

Enfoque isoeléctrico

El punto isoeléctrico (pI) de las variantes iniciales se determinó utilizando electroforesis capilar en un Maurice C (Protein Simple). Cada muestra de 200 μL contenía 0,35% de metil-celulosa (Protein Simple), 4% de farmalita 3 - 10 (GE Healthcare), 10 mM de arginina (Protein Simple), 0,2 mg mL⁻¹ de anticuerpo y los marcadores 4.05 y 9.99 pI (Protein Simple). La muestra se cargó en el capilar durante 1 min a 1500 V, seguido por una fase de separación durante 6 min a 3000 V y se vigiló utilizando fluorescencia con triptófano. El pI para cada variante se determinó utilizando el programa informático Maurice C y se definió como el pH con el máximo de fluorescencia para las especies principales.

ELISA del factor reumatoide (RF) con formación de puente homogéneo

Los anticuerpos se biotinilaron y se marcaron con digoxigenina, utilizando los kits para marcar anticuerpos con digoxigenina EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotina y Mix-n-Stain™ (Biotium) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se preparó una

solución de reserva que contenía 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de los anticuerpos biotinilados y marcados con digoxigenina para cada variante y se mezcló en una relación 1:1 con 300 U/mL de RF (Abcam). Después de una incubación a temperatura ambiente durante 20 horas, se añadieron 100 μL de cada mezcla de anticuerpo-RF a las placas Streptawell™ (Sigma-Aldrich) y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. La placa se lavó tres veces con PBS pH 7,4 con Tween-20 al 0,05% y se añadieron 100 μL de una dilución 1:2000 de anticuerpo secundario anti-digoxigenina conjugado con HRP (Abcam) a cada pocillo. Después de una incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron y trataron con 100 μL del sustrato TMB (Abcam) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 100 μL de la solución de detención (Abcam) y la absorbancia se midió a 450 nm en un lector de placas SpectraMax®. Un pocillo que no contenía la mezcla de anticuerpo-RF, proporcionaba la sustracción en blanco y el experimento se repitió tres veces. Se determinaron los valores de P utilizando la prueba t de student.

15 **Ejemplo 2: Selección con Octet de mutaciones puntuales por saturación en medios condicionados**

FcRn es un heterodímero de un dominio α similar a la clase I del MHC y una subunidad de β 2-microglobulina (β 2-m) (FIG. 1A), común para una mayoría de los receptores de Fc. FcRn reconoce regiones en la cadena pesada Fc del anticuerpo, distintas de los otros Fc γ Rs (véase, por ejemplo, Oganessian et al., *J Biol Chem* (2014) 289: 7812-24; y Shields et al., *J Biol Chem* (2001) 276: 6591-604).

Con el fin de identificar variantes con tasas de disociación de FcRn más lentas que el anticuerpo WT, se diseñó un ensayo basado en interferometría de biocapa (BLI) para seleccionar las variantes de anticuerpos en medios condicionados, de una manera con rendimiento elevado (FIG. 2A). Este ensayo se desarrolló utilizando varias variantes de referencia que mejoraban (AAA, LS e YTE) o reducían (H435A, H310A/H435Q) la afinidad hacia FcRn a pH 6,0, en comparación con el anticuerpo WT. Los biosensores NiNTA capturaban el antígeno marcado con his y, posteriormente, cada variante de anticuerpo a pH 7,4 para mimetizar los medios condicionados (FIG. 2A). Las cinéticas de unión a FcRn de rata (rFcRn) a pH 6,0, que tiene una tasa de disociación 25 veces más lenta desde IgG1 humana y es más susceptible para estudios Octet que el FcRn humano (hFcRn), se midieron para cada una de las variantes (FIG. 2B). Las variantes H435A (FIG. 2B, guiones largos intercalados con un punto) y H310A/H435Q (FIG. 2B, guiones largos intercalados con dos puntos) muestran poca o ninguna cinética de unión a FcRn (véase también, por ejemplo, Shields et al., *supra*; Medesan et al., *J Immunol.* (1997) 158: 2211-7; y

Raghavan et al., *Biochemistry* (1995) 34(45): 14649-57). Las variantes AAA (FIG. 2B, guiones cortos), LS (FIG. 2B, guiones cortos intercalados con un punto) e YTE (FIG. 2B, guiones largos) todas ellas presentan cinéticas de disociación más lentas, en comparación con el WT (FIG. 2B, línea continua) con una reducción de 2-7,3 veces en la tasa de disociación de FcRn. Esto demuestra que la selección con Octet es adecuada para distinguir entre variantes con cinéticas de disociación de rFcRn alteradas.

Un anticuerpo de IgG1, mAb1, servía como un sistema modelo para crear un banco de mutagénesis por saturación para seleccionar mutantes con una tasa de disociación de FcRn reducida. Se seleccionaron once posiciones en la región Fc de mAb1 basándose en su proximidad o contribución directa a la interfaz de FcRn (FIGS. 1A y 1B) (véase, por ejemplo, Oganessian et al., *supra*; y Shields et al., *supra*). Todas las mutaciones puntuales en esas posiciones se construyeron utilizando mutagénesis dirigida al sitio y se transfectaron en células Expi293 para la expresión. La selección de los medios condicionados se realizó para los mutantes del banco por saturación como se ha descrito anteriormente. Los sensogramas de Octet para la unión a FcRn normalizada para un subgrupo de las variantes, se muestra en la FIG. 2C (guiones largos) con el tipo silvestre (FIG. 2C, guiones largos gruesos) y el control negativo simulado (FIG. 2C, línea punteada). La simulación mostraba una falta de unión a FcRn observable. Varios mutantes alteraban claramente la unión de rFcRn, a medida que no se observaba ningún cambio de señal en los perfiles cinéticos (FIG. 2C, guiones largos, situados por debajo de la línea punteada (simulación)). El punto de corte para las variantes con una tasa de disociación de FcRn mejorada se definió como tres desviaciones estándar menores que la media del anticuerpo WT. En el subconjunto de mutaciones que se muestran en la FIG. 2C, dos (FIG. 2C, líneas continuas) tenían tasas de disociación significativamente reducidas, en comparación con el anticuerpo de tipo silvestre (FIG. 2C, guiones largos gruesos), mientras que las variantes restantes tenían tasas de disociación de rFcRn similares (FIG. 2C, guiones cortos intercalados con un punto) o más rápidas (FIG. 2C, guiones largos por encima de la línea punteada (simulación)).

Las tasas de disociación de rFcRn para todas las mutaciones puntuales únicas se muestran en la FIG. 2D y la FIG. 14, mediante posición y mutación. En la FIG. 14, los datos se clasifican en una de cuatro categorías, dependiendo del número de veces de cambio de la tasa de disociación de rFcRn, en comparación con el tipo silvestre y las especies de tipo silvestre se indican por cuadrados negros.

En la FIG. 14, el número de veces de cambio de la tasa de disociación de

rFcRn para todas las posibles sustituciones en las once posiciones del banco por saturación, se normalizó con el promedio del anticuerpo WT y el color codificado. Todos los mutantes se incluían en una de las cuatro categorías: poca o ninguna unión (gris oscuro), tasa de disociación de rFcRn más rápida (gris), tasa de disociación de rFcRn como WT (líneas horizontales) y tasa de disociación de rFcRn más lenta (cuadrículas). Múltiples variantes poseían tasas de disociación de rFcRn más lentas que el anticuerpo WT (cuadrículas).

Los mutantes coloreados en gris oscuro en la FIG. 14 mostraban poca o ninguna unión a rFcRn de una manera similar a la simulación (FIG. 2C, línea punteada) y se localizaban en el bucle M252, I253 y S254. Las únicas mutaciones en I253 eran metionina y valina, y ambas incrementan significativamente la tasa de disociación de rFcRn, favoreciendo además la importancia de I253 en la interacción con FcRn. Otras 120 variantes (FIG. 2D y FIG. 14, rectángulos gris claro) desestabilizaban la interacción con rFcRn, estando localizado aproximadamente el 50% en cada uno de los dominios C_H2 y C_H3. Veinticinco mutantes tienen una tasa de disociación similar a WT (FIG. 2D y FIG. 14, rectángulos blancos) en donde ocho de la posición 11 poseen al menos una mutación similar a WT (FIG. 14, rectángulos blancos). Las siguientes mutaciones tenían una tasa de disociación de rFcRn significativamente reducida, en comparación con el tipo silvestre (FIG. 2D y FIG. 14, rectángulos negros): M252Y, T256D/E, K288D/N, T307A/E/F/M/Q/W, E380C, N434F/P/Y e Y436H/N/W. Las mutaciones M252Y, N434F y N434Y poseían tasas de disociación que eran más del doble de lentas que el anticuerpo WT (FIG. 2D). Esas mutaciones se expresaban y se purificaban con una cromatografía de proteína A para una caracterización cinética adicional de FcRn *in vitro*.

25 **Ejemplo 3: Cinéticas de unión a FcRn con Biacore™ a pH 6,0**

Las variantes AAA, LS e YTE sirvieron como controles positivos en las mediciones de las cinéticas de unión a FcRn, utilizando Biacore™, tanto a FcRn humano como de rata a pH 6,0. Una unión dependiente de la concentración a FcRn se observó para todas las variantes, incluyendo el tipo silvestre, la referencia (FIG. 3) y los candidatos iniciales (FIGs. 4A y 4B) y el perfil de unión de una sola inyección con FcRn humano y de rata se muestra en las FIGs. 5A y 5B, respectivamente. El anticuerpo de tipo silvestre tenía una afinidad para unirse a FcRn humano y de rata con afinidades de 2380 ± 470 nM y de 207 ± 43 nM, respectivamente (Tabla 1).

35 Tabla 1: Parámetros de caracterización *in vitro* de anticuerpos iniciales purificados para mAb1

Mutante	Octet pH 6,0	Columna de afinidad para FcRn	DSF	Biacore™ pH 6,0						Biacore™ pH 7,4	
				hFcRn			rFcRn			hFcRn	rFcRn
	Tasa de disoc. de rFcRn	pH de elución	T _m (°C)	Tasa de asociación	Tasa de disociación	K _{D,app}	Tasa de asociación	Tasa de disociación	K _{D,app}	UR en estado estacionario	UR en estado estacionario
E380C	2,08 ± 0,18	7,18 ± 0,11	64,7 ± 0,5	1,73 ± 0,39	4,57 ± 1,50	>10,000	1,71 ± 0,25	106 ± 1	6310 ± 880	5,7 ± 0,1	27,7 ± 4,0
K288D	3,79 ± 0,06	7,33 ± 0,10	65,8 ± 0,1	3,31 ± 1,10	5,13 ± 0,75	>10,000	6,61 ± 3,01	8,43 ± 0,60	149 ± 63	3,8 ± 0,2	21,9 ± 3,1
K288N	4,11 ± 0,08	7,39 ± 0,02	66,7 ± 0,3	4,12 ± 1,42	4,54 ± 0,34	>10,000	6,42 ± 2,80	10,7 ± 0,9	190 ± 73	3,9 ± 0,2	20,4 ± 2,7
M252Y	0,95 ± 0,03	7,88 ± 0,03	64,4 ± 0,2	5,50 ± 1,83	1,43 ± 0,23	3100 ± 1500	10,6 ± 3,1	2,64 ± 0,62	25 ± 3	8,6 ± 0,9	57,7 ± 10,7
N434F	1,18 ± 0,05	8,30 ± 0,05	67,8 ± 0,2	35,4 ± 15,3	0,50 ± 0,08	165 ± 73	12,6 ± 1,4	3,36 ± 1,79	26 ± 13	20,1 ± 3,4	54,9 ± 9,1
N434P	3,80 ± 0,08	7,56 ± 0,02	63,6 ± 0,5	2,42 ± 0,54	3,35 ± 1,10	>10,000	3,44 ± 0,07	6,67 ± 0,18	194 ± 9	3,5 ± 0,4	4,3 ± 0,6
N434Y	1,33 ± 0,04	8,46 ± 0,02	67,3 ± 0,5	35,9 ± 9,6	0,52 ± 0,10	137 ± 33	14,5 ± 1,82	3,46 ± 1,86	23 ± 12	22,6 ± 4,2	47,0 ± 6,3
T256D	2,24 ± 0,03	7,82 ± 0,07	64,7 ± 0,2	4,41 ± 1,72	2,51 ± 0,65	6700 ± 3540	6,09 ± 1,84	4,84 ± 0,08	86 ± 27	5,8 ± 0,6	30,4 ± 3,4
T256E	3,26 ± 0,04	7,63 ± 0,06	66,3 ± 0,6	3,90 ± 2,37	3,38 ± 0,28	>10,000	6,29 ± 1,59	6,94 ± 0,97	113 ± 15	4,8 ± 0,5	23,0 ± 2,7
T307A	2,98 ± 0,06	7,61 ± 0,03	68,0 ± 0,4	2,85 ± 0,72	2,91 ± 0,46	>10,000	6,09 ± 2,72	7,08 ± 0,67	132 ± 48	5,2 ± 0,6	23,1 ± 2,8
T307E	3,29 ± 0,08	7,58 ± 0,03	70,2 ± 0,5	4,37 ± 1,63	2,98 ± 0,37	8130 ± 5070	5,55 ± 2,82	6,03 ± 0,20	141 ± 65	5,7 ± 0,7	21,5 ± 2,6
T307F	2,80 ± 0,07	7,61 ± 0,03	70,2 ± 0,3	2,70 ± 0,83	2,92 ± 0,13	>10,000	5,69 ± 2,83	6,15 ± 0,14	131 ± 63	4,9 ± 0,7	21,9 ± 2,7

Mutante	Octet pH 6,0	Columna de afinidad para FcRn	DSF	Biacore™ pH 6,0						Biacore™ pH 7,4	
				hFcRn			rFcRn			hFcRn	rFcRn
				Tasa de asociación	Tasa de disociación	$K_{D,app}$	Tasa de asociación	Tasa de disociación	$K_{D,app}$	UR en estado estacionario	UR en estado estacionario
T307M	3,47 ± 0,13	7,40 ± 0,08	70,0 ± 0,4	4,08 ± 0,83	3,87 ± 0,28	>10,000	6,81 ± 2,34	17,1 ± 4,0	279 ± 140	4,4 ± 0,7	15,3 ± 1,9
T307Q	1,84 ± 0,05	7,86 ± 0,06	70,3 ± 0,6	3,96 ± 1,10	2,15 ± 0,22	5720 ± 1530	7,35 ± 2,15	4,04 ± 0,28	58 ± 16	6,4 ± 0,8	24,3 ± 3,0
T307W	2,42 ± 0,08	7,75 ± 0,07	63,0 ± 0,5	3,33 ± 0,83	2,77 ± 0,29	8740 ± 2440	7,11 ± 2,29	7,37 ± 0,41	111 ± 32	5,8 ± 0,7	19,2 ± 3,3
Y436H	3,22 ± 0,08	7,33 ± 0,05	68,7 ± 0,3	2,59 ± 0,78	6,06 ± 1,00	>10,000	5,06 ± 0,13	7,30 ± 0,88	131 ± 9	3,6 ± 0,5	16,3 ± 1,8
Y436N	5,25 ± 0,22	7,22 ± 0,05	65,8 ± 0,5	4,60 ± 2,36	7,37 ± 3,34	>10,000	10,1 ± 4,9	20,3 ± 3,1	233 ± 86	3,6 ± 0,4	17,4 ± 2,0
Y436W	5,18 ± 0,18	7,39 ± 0,03	68,6 ± 0,7	2,84 ± 1,90	4,62 ± 0,92	>10,000	3,44 ± 2,18	23,7 ± 7,7	1140 ± 950	3,7 ± 0,4	10,3 ± 1,2
WT	5,01 ± 0,45	7,37 ± 0,05	69,0 ± 0,2	16,2 ± 2,9	3,86 ± 0,38	2380 ± 470	7,26 ± 1,01	15,2 ± 0,23	207 ± 43	4,3 ± 1,0	12,2 ± 0,5
AAA	3,77 ± 1,03	7,94 ± 0,06	61,3 ± 0,6	8,37 ± 1,82	1,44 ± 0,04	1780 ± 380	15,7 ± 3,3	11,7 ± 1,1	77 ± 18	13,9 ± 3,1	23,6 ± 4,9
LS	3,38 ± 0,23	8,29 ± 0,03	68,5 ± 0,3	19,3 ± 3,5	0,52 ± 0,03	272 ± 40	9,08 ± 1,58	6,58 ± 0,39	74 ± 9	18,3 ± 4,6	24,8 ± 4,8
YTE	0,66 ± 0,17	8,14 ± 0,03	61,2 ± 0,3	14,3 ± 4,4	0,45 ± 0,07	342 ± 117	6,52 ± 0,46	1,21 ± 0,21	18 ± 2	13,2 ± 3,5	53,9 ± 1,2

Todos los datos mostrados en la Tabla 1 se obtuvieron utilizando las técnicas experimentales mostradas en la parte superior de cada columna.

- La tasa de disociación de rFcRn mediante Octet utilizando proteínas purificadas, se midió como una comparación con las constantes cinéticas obtenidas a partir de la selección en medios condicionados. El pH de elución se determinó

mediante cromatografía por afinidad de FcRn por triplicado ($n = 3$) y DSF analizó la estabilidad térmica por triplicado ($n = 3$). Las cinéticas de unión a FcRn para FcRn humano y de rata se obtuvieron a partir de Biacore™ con una serie de concentraciones de anticuerpos por duplicado ($n = 2$) y ajustadas independientemente. La respuesta de unión en estado estacionario (UR) de cada variante con FcRn humano y de rata a pH 7,4 se midió con anticuerpo 1000 nM por triplicado ($n = 3$) utilizando Biacore™. Las unidades para cada medición son las siguientes: tasa de disociación con Octet a pH 6,0 de rFcRn ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$); pH de elución (unidad-menos); DSF- T_m ($^{\circ}\text{C}$); tasa de asociación con Biacore™ a pH 6,0 de hFcRn ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), tasa de disociación ($\times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$) y $K_{D,app}$ ($\times 10^9 \text{ M}$); tasa de asociación con Biacore™ a pH 6,0 de rFcRn ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), tasa de disociación ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) y $K_{D,app}$ ($\times 10^9 \text{ M}$); y respuesta de unión en estado estacionario (UR) con Biacore™ a pH 7,4.

En la FIG. 5B, las variantes AAA (línea punteada), LS (guiones intercalados con dos puntos) e YTE (guiones intercalados con un punto) tenían una afinidad de unión mejorada de 1,6 y 10,4 veces, en comparación con el WT. La identidad de la variante de referencia con la afinidad hacia FcRn más fuerte, era específica de especie, ya que LS tenía la afinidad más fuerte hacia hFcRn, mientras que rFcRn tenía una afinidad más fuerte hacia YTE (Tabla 2A).

Tabla 2A: Parámetros de caracterización *in vitro* de anticuerpos purificados con combinación doble para mAb1

Variante	Columna de afinidad para FcRn	DSF	Biacore™ pH 6,0						Biacore™ pH 7,4	
			hFcRn			rFcRn			hFcRn	rFcRn
	pH de elución	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	Tasa de asociación	Tasa de disociación	$K_{D,app}$	Tasa de asociación	Tasa de disociación	$K_{D,app}$	UR en estado estacionario	UR en estado estacionario
MDQN	7,92 ± 0,06	67,9 ± 0,4	3,76 ± 0,38	8,72 ± 0,10	232 ± 24	1,33 ± 0,22	1,27 ± 0,07	9,54 ± 1,66	10,7 ± 1,0	39,1 ± 4,5
MDTE	8,41 ± 0,07	62,3 ± 0,2	9,68 ± 0,64	2,90 ± 0,04	29,9 ± 2,0	2,18 ± 0,20	0,39 ± 0,01	1,78 ± 0,17	29,2 ± 4,0	63,0 ± 6,0
MDTY	8,45 ± 0,04	61,5 ± 0,2	18,3 ± 0,6	2,85 ± 0,01	15,6 ± 0,5	4,13 ± 0,15	0,25 ± 0,35	0,60 ± 0,85	37,1 ± 5,0	71,6 ± 6,6
MDWN	7,92 ± 0,04	57,8 ± 0,4	5,29 ± 0,14	8,92 ± 0,32	169 ± 8	1,57 ± 0,12	1,29 ± 0,01	8,24 ± 0,85	12,2 ± 1,3	42,1 ± 4,7
MEQN	7,84 ± 0,06	68,0 ± 0,5	2,87 ± 0,01	14,3 ± 0,2	499 ± 6	1,46 ± 0,25	1,56 ± 0,94	10,7 ± 6,7	5,8 ± 0,6	23,4 ± 3,1
METE	8,23 ± 0,03	64,1 ± 0,7	5,36 ± 1,41	4,19 ± 0,03	78,2 ± 20,5	1,08 ± 0,11	0,81 ± 0,07	7,53 ± 1,03	23,3 ± 3,2	59,0 ± 5,6

Variante	Columna de afinidad para FcRn	DSF	Biacore™ pH 6,0						Biacore™ pH 7,4	
			hFcRn			rFcRn			hFcRn	rFcRn
	pH de elución	T _m (°C)	Tasa de asociación	Tasa de disociación	K _{D,app}	Tasa de asociación	Tasa de disociación	K _{D,app}	UR en estado estacionario	UR en estado estacionario
<u>MET</u> Y	8,38 ± 0,04	63,5 ± 0,6	6,28 ± 1,62	3,93 ± 0,02	62,6 ± 16,2	1,27 ± 0,11	0,98 ± 0,07	7,71 ± 0,84	26,8 ± 3,7	62,2 ± 6,3
<u>MEW</u> N	7,78 ± 0,04	58,2 ± 0,4	4,32 ± 0,36	14,0 ± 0,1	323 ± 27	1,81 ± 0,01	1,92 ± 0,05	10,6 ± 0,26	7,7 ± 0,9	33,0 ± 4,2
<u>MTQ</u> E	8,56 ± 0,14	69,3 ± 0,2	5,74 ± 1,05	2,46 ± 0,05	42,9 ± 7,9	1,04 ± 0,07	0,40 ± 0,01	3,89 ± 0,26	34,2 ± 4,6	62,5 ± 7,6
<u>MTQ</u> Y	8,68 ± 0,15	69,2 ± 0,2	6,22 ± 1,38	2,02 ± 0,06	32,4 ± 7,3	1,16 ± 0,06	0,48 ± 0,01	4,11 ± 0,23	38,4 ± 5,2	63,0 ± 7,7
<u>MTW</u> E	8,61 ± 0,06	60,9 ± 0,2	7,87 ± 0,31	3,01 ± 0,08	38,2 ± 1,8	2,11 ± 0,06	0,57 ± 0,01	2,70 ± 0,08	30,5 ± 4,2	65,1 ± 6,4
<u>MTW</u> Y	8,62 ± 0,14	62,1 ± 0,5	14,8 ± 0,8	3,17 ± 0,03	21,5 ± 1,2	4,80 ± 0,07	0,30 ± 0,04	0,62 ± 0,08	37,2 ± 4,9	69,6 ± 7,0
<u>YDT</u> N	8,29 ± 0,06	59,6 ± 0,9	6,33 ± 1,23	5,93 ± 0,20	93,6 ± 18,4	2,85 ± 0,11	1,67 ± 0,16	5,86 ± 0,61	9,7 ± 1,8	56,0 ± 5,6
<u>YET</u> N	7,83 ± 0,06	60,7 ± 0,7	5,92 ± 0,05	7,57 ± 0,30	128 ± 5	3,24 ± 0,07	2,73 ± 0,02	8,43 ± 0,20	9,8 ± 1,2	55,1 ± 6,1
<u>YTON</u>	7,87 ± 0,06	63,1 ± 0,1	3,45 ± 0,29	9,60 ± 0,01	278 ± 23	2,55 ± 0,24	1,05 ± 0,63	4,11 ± 2,51	10,6 ± 1,2	49,2 ± 5,6
<u>YTE</u> E	8,56 ± 0,09	62,2 ± 0,1	12,7 ± 0,7	2,30 ± 0,01	18,0 ± 1,0	4,03 ± 0,06	0,12 ± 0,02	0,29 ± 0,04	43,8 ± 5,8	79,3 ± 9,9
<u>YTY</u> Y	8,95 ± 0,02	62,0 ± 0,1	20,6 ± 0,6	1,71 ± 0,02	8,32 ± 0,2	5,40 ± 0,07	0,14 ± 0,04	0,26 ± 0,08	54,1 ± 7,1	67,9 ± 7,9
<u>YTN</u> N	8,14 ± 0,02	59,3 ± 0,2	4,83 ± 0,20	5,70 ± 0,03	118 ± 5	2,08 ± 0,07	1,09 ± 0,03	5,21 ± 0,22	15,9 ± 1,7	66,1 ± 7,1

Una gran mayoría de las variantes iniciales tanto para FcRn humano como de rata (FIGs. 5A y 5B, líneas continuas con diversos sombreados) tenían tasas de asociación significativamente más lentas que el WT o las variantes de referencia (>2 veces) (Tabla 1). Las mutaciones N434F y N434Y eran las únicas variantes que mostraban un aumento de la tasa de asociación para ambas especies de FcRn. Sin estar limitados por ninguna teoría, como consecuencia de las cinéticas de asociación más lentas con hFcRn, las afinidades de unión aparentes de las variantes iniciales eran generalmente más débiles que WT, a diferencia de rFcRn (FIGs. 5C y 5D, Tabla 1). Las afinidades para rFcRn eran más débiles que las de YTE (FIG. 5D, líneas

diagonales de cara a la parte inferior izquierda, Tabla 2A).

Sin estar limitados por ninguna teoría, esos resultados indicaban que una sola mutación no era suficiente para mejorar la afinidad para superar a la de las variantes LS e YTE. La clasificación de las tasas de disociación de FcRn (debido a las afinidades de unión débiles de las variantes hacia hFcRn) reveló un subgrupo con tasas de disociación reducidas para FcRn humano y de rata: M252Y, N434F/P/Y, T256D/E y T307A/E/F/Q/W (Tabla 2A). Esas variantes tienen un mayor interés en la combinación para mejorar adicionalmente las capacidades de unión a FcRn de la región Fc para superar a las variantes de referencia.

Los parámetros de caracterización *in vitro* para las variantes iniciales se muestran en la Tabla 2B.

Tabla 2A: Parámetros de caracterización *in vitro* de las variantes iniciales

mAb1	Columna de afinidad para FcRn	DSF	Biacore™	Biacore™ pH 6,0				Biacore™ pH 7,4	
			FcyRIIIa V158	hFcRn			rFcRn	hFcRn	rFcRn
Variante	pH	T _m (°C)	Nº veces de cambio de la afinidad	Tasa de asociación	Tasa de disociación	K _{D,app}	K _{D,app}	UR en estado estacionario	UR en estado estacionario
WT	7,37	69,0 ± 0,2	1,00	16,2 ± 2,9	3,9 ± 0,4	2380 ± 470	207 ± 43	4,2 ± 0,9	13,0 ± 3,2
LS	8,29	68,5 ± 0,3	1,04 ± 0,04	1,9 ± 0,4	5,0 ± 0,1	272 ± 40	74 ± 9	18,3 ± 4,6	24,8 ± 4,8
YTE	8,14	61,2 ± 0,3	0,52 ± 0,03	1,4 ± 0,4	4,7 ± 0,1	342 ± 117	18 ± 2	13,2 ± 3,5	53,9 ± 1,2
M252Y	7,88	64,4 ± 0,2	0,46 ± 0,03	5,5 ± 1,8	1,4 ± 0,2	>3000	25 ± 3	8,6 ± 1,0	50,5 ± 5,6
N434F	8,30	67,8 ± 0,2	1,16 ± 0,08	35 ± 15	0,5 ± 0,1	165 ± 73	26 ± 13	22,2 ± 2,6	61,5 ± 6,5
N434Y	8,46	67,3 ± 0,5	1,41 ± 0,06	36 ± 10	0,5 ± 0,1	137 ± 33	23 ± 12	25,5 ± 2,9	66,0 ± 7,1
T256D	7,82	64,7 ± 0,2	0,92 ± 0,04	4,4 ± 1,7	2,5 ± 0,7	>3000	86 ± 27	5,8 ± 0,5	23,2 ± 2,8
T256E	7,63	66,3 ± 0,6	0,89 ± 0,04	3,9 ± 2,4	3,4 ± 0,2	>3000	113 ± 15	4,5 ± 0,4	17,0 ± 2,1
T307Q	7,86	70,3 ± 0,6	1,00 ± 0,04	4,0 ± 1,1	2,2 ± 0,2	>3000	58 ± 16	6,6 ± 0,7	31,3 ± 3,7

mAb1	Columna de afinidad para FcRn	DSF	Biacore™	Biacore™ pH 6,0				Biacore™ pH 7,4	
			FcyRIIIa V158	hFcRn			rFcRn	hFcRn	rFcRn
Variante	pH	T _m (°C)	Nº veces de cambio de la afinidad	Tasa de asociación	Tasa de disociación	K _{D,app}	K _{D,app}	UR en estado estacionario	UR en estado estacionario
T307W	7,75	63,0 ± 0,5	0,97 ± 0,04	3,3 ± 0,8	2,8 ± 0,3	>3000	111 ± 32	5,6 ± 0,7	21,9 ± 2,8
DQ	7,92	67,9 ± 0,4	0,73 ± 0,03	3,8 ± 0,4	8,7 ± 0,1	232 ± 24	9,5 ± 1,7	10,7 ± 1,0	39,1 ± 4,5
DW	7,92	57,8 ± 0,4	0,89 ± 0,04	5,3 ± 0,1	8,9 ± 0,3	169 ± 8	8,2 ± 0,9	12,2 ± 1,3	42,1 ± 4,7
YD	8,29	59,6 ± 0,9	0,48 ± 0,02	6,3 ± 1,2	5,9 ± 0,20	94 ± 18	5,9 ± 0,6	9,7 ± 1,8	56,0 ± 5,6

En la Tabla 2B, todos los datos se obtuvieron utilizando las técnicas experimentales de la parte superior de cada columna. La cromatografía por afinidad para FcRn, DSF y la unión a FcyRIIIa se realizaron por triplicado (n = 3). Las cinéticas de unión a FcRn a FcRn humano y de rata se obtuvieron por cuadruplicado y se ajustaron de manera independiente. Unidades: DSF-T_m (°C); unión a FcyRIIIa (nº de veces de cambio con relación a WT), tasa de asociación con Biacore™ a pH 6,0 de hFcRn (x10⁴ M⁻¹ s⁻¹), tasa de disociación (x10⁻¹ s⁻¹) y K_{D,app} (x10⁹ M); Biacore™ pH 6,0 rFcRn K_{D,app} (x10⁹ M); UR en estado estacionario (UR) con Biacore™ a pH 7,4 de hFcRn y rFcRn.

Ejemplo 4: Las variantes por combinación disminuyen adicionalmente la tasa de disociación de la unión a FcRn

Se localizaron múltiples mutaciones iniciales en una sola posición (FIG. 14, rectángulos negros), tales como T307 y N434, en donde se identificaron seis y tres mutaciones, respectivamente, que mostraban cinéticas de disociación de FcRn más lentas. Solo se utilizaron mutaciones con las tasas de disociación de FcRn más lentas frente a hFcRn en esas posiciones, para la creación de variantes por combinación. En ese caso, T307Q, T307W, N434F y N434Y se mezclaron con M252Y, T256D y T256E para obtener variantes dobles, triples y cuádruples utilizando PCR con mezcla de cebadores y mutagénesis dirigida al sitio. En total, el banco por combinación consistía en 54 variantes, incluyendo las siete variantes iniciales únicas, 18 dobles,

20 triples, 8 cuádruples y el anticuerpo WT. La nomenclatura de esas variantes es la siguiente: el ruido de fondo de tipo silvestre contiene M252, T256, T307 y N434 y se denomina ahora MTTN. Como tal, la variante triple, YTQY, contiene las mutaciones M252Y, T307Q y N434Y, a la vez que conserva la treonina WT en la posición 256.

5 Al igual que con las mutaciones únicas, se utilizó la cinética de unión a FcRn a pH 6,0 utilizando Biacore™ para determinar qué variantes por combinación tienen una afinidad mejorada. En las FIGs. 6A y 6B se muestra el rastro de la cinética de unión a FcRn representativa de cada una de las mutaciones únicas (guiones largos intercalados con dos puntos), dobles (guiones largos intercalados con un punto),
10 triples (guiones largos) y cuádruples (guiones cortos), en comparación con el WT (línea punteada) y la variante de referencia con la afinidad más fuerte hacia sus respectivas especies de FcRn (hFcRn: LS (guiones largos intercalados con dos puntos); rFcRn: YTE (línea continua)). Las tasas de asociación y disociación de hFcRn (FIG. 6C) revelaron que dos variantes únicas, 15 dobles, 18 triples y ocho cuádruples tenían una afinidad de unión mejorada en comparación con la variante LS (FIG. 6C, línea punteada). De manera similar, todas las combinaciones, excepto una variante triple, tenían una afinidad más fuerte hacia rFcRn que YTE (FIG. 6D, líneas diagonales de cara a la parte inferior izquierda). En el caso de hFcRn, las mutaciones potenciadoras de FcRn adicionales aumentaban adicionalmente la
20 afinidad de la unión (FIG. 6C). Las cinco combinaciones con la afinidad más fuerte hacia hFcRn eran todas variantes cuádruples (FIG. 6C, verificación) con afinidades de unión aproximadamente 500 veces mayores que las de tipo silvestre. No se produjo ningún fenómeno similar con rFcRn (FIG. 6D), ya que las variantes con la mayor afinidad eran variantes dobles (FIG. 6D, líneas horizontales). Las variantes
25 triples (FIG. 6D, líneas verticales) y cuádruples (FIG., 6D, verificación) normalmente mostraban solo ligeras disminuciones en la tasa de disociación (menos de 2 veces), pero también mostraban tasas de asociación disminuidas (FIG. 6D). Sin estar limitados por ninguna teoría, esos resultados sugieren que existe posiblemente un límite inferior con respecto a la afinidad de unión aparente a FcRn (aproximadamente
30 0,5 nM) que se ha alcanzado con rFcRn, pero no con hFcRn (FIG. 6B). En total, más de 40 variantes por combinación tenían una afinidad más fuerte que las variantes de referencia y se requería una caracterización adicional para seleccionar combinaciones con propiedades favorables para estudios *in vivo*.

35 **Ejemplo 5: Las variantes por combinación conservan una unión significativa a pH fisiológico**

Como resultado de la afinidad hacia FcRn significativamente mejorada a pH

6,0, se investigó el efecto sobre la dependencia del pH utilizando cromatografía por afinidad a FcRn y mediciones en estado estacionario con Biacore™ a pH 7,4. La cromatografía por afinidad a FcRn emplea un gradiente de pH lineal para medir directamente la alteración de la dependencia del pH debido a las mutaciones. Las variantes H435A y H310A/H435Q, con una unión débil a FcRn, no se unían a la columna independientemente del pH (FIG. 8A). El WT eluía cerca del pH fisiológico (pH $7,37 \pm 0,05$), mientras que AAA, LS e YTE requerían un pH mayor (Tabla 2B). Todas las variantes por combinación y las siete variantes iniciales únicas, requerían un pH más alto que WT para eluir desde la columna de afinidad (FIGs. 8A y 8C). Las variantes N434F/Y eluían a un pH mayor que LS (Tabla 2B) lo que, sin pretender estar limitado por una teoría científica, indica que esas variantes, tanto solas como en combinación, alteran la dependencia del pH. Los cromatogramas representativos mostraban un desplazamiento claro hacia un pH de elución más alto, con el número de mutaciones (FIGs. 9A y 9B). Una fuerte correlación ($R^2 = 0,94$) entre el pH de elución y las tasas de disociación de hFcRn (FIG. 9C) indica que la tasa de disociación más lenta de FcRn a pH 6,0 contribuía directamente al pH de elución incrementado para las variantes de FcRn.

Los experimentos de cinética de unión a FcRn se realizaron a pH 7,4 utilizando Biacore™ para medir la actividad de unión residual en condiciones fisiológicas. La UR en estado estacionario se empleó como una medida de la afinidad de unión a FcRn residual, ya que algunas variantes mostraban cinéticas no confiables y poca o ninguna unión a ese pH. En las FIGs. 7A y 7B se muestran rastros de las cinéticas representativas de las variantes únicas (guiones largos intercalados con dos puntos), dobles (guiones largos intercalados con un punto), triples (guiones largos) y cuádruples (guiones cortos), en comparación con LS (FIG. 7A, línea continua) e YTE (FIG. 7B, línea continua). Esas dos variantes mostraban la mayor unión residual a FcRn humano y de rata a pH 7,4, respectivamente. Una mayoría de las variantes iniciales únicas tenían una unión a FcRn ligeramente elevada, en comparación con WT ($4,3 \pm 1,0$ UR), pero menor que AAA ($13,1 \pm 1,7$ UR), LS ($18,5 \pm 2,6$ UR) e YTE ($13,1 \pm 1,6$ UR), excepto para las mutaciones N434F/Y (Tablas 2A y 2B). Las variantes por combinación también poseían una unión residual significativa con ambas especies de FcRn a pH 7,4 (FIGs. 7A y 7B), con un grado incluso mayor que 434F/Y. Sin estar limitado por ninguna teoría, un candidato ideal para iniciales estudios *in vivo* son las variantes con una unión a FcRn incrementada a pH bajo (tales como las variantes AAA, LS e YTE), pero que conservan un bajo nivel de unión a pH elevado, de una manera similar a WT. En un gráfico mostrado en las FIGs. 7C y 7D,

esas combinaciones ocuparían el cuadrante izquierdo inferior indicado para las afinidades de las variantes LS e YTE con cada pH, para FcRn humano y de rata, respectivamente.

Ejemplo 6: Cromatografía de afinidad para FcRn

- 5 Las variantes por combinación mostraban una correlación positiva moderada (hFcRn: $R^2 = 0,69$, rFcRn: $R^2 = 0,71$) entre la afinidad de unión aparente a pH 6,0 y la UR en estado estacionario a pH 7,4 (FIGs. 7C y 7D). Sin estar limitados por ninguna teoría, esos resultados indican que una afinidad significativamente más alta a pH 6,0 se traduce normalmente en una mayor unión residual a FcRn a pH 7,4. Esas
- 10 variantes podrían permanecer unidas a FcRn en la corriente sanguínea y tienen semividas en suero cortas y/o favorecer su aclaramiento, de modo similar a las mutaciones Abdeg de alta afinidad a FcRn (YTEKF; véase, por ejemplo, Swiercz et al., *J Nucl Med.* (2014) 55: 1204-7; y Vaccaro et al., *Nat Biotechnol.* (2005) 23: 1283-8). Ya que la interacción IgG-FcRn es dependiente del pH y se produce solo a un pH
- 15 bajo ($< \text{pH } 6,5$), las mutaciones por saturación pueden fortalecer la interacción a través de contribuciones hidrófobas derivadas de la carga, lo que puede alterar la desprotonación de los restos de histidina decisivos (FIG. 1B, como se ha indicado) y debilitar su interacción a pH fisiológico. Como resultado, la interacción de la unión a FcRn se vuelve en consecuencia menos sensible al pH del entorno.
- 20 La cromatografía por afinidad a FcRn emplea un gradiente lineal de pH para medir directamente la alteración de la dependencia del pH de las interacciones de FcRn (véase, por ejemplo, Schlothauer et al., *supra*). La cromatografía por afinidad a FcRn con las variantes AAA, LS, YTE, H435A y H310A/H435Q reveló que H435A (FIG. 8A, línea gris clara continua) y H310A/H435Q (FIG. 8A, AQ, línea gris oscura
- 25 continua) no se unen a FcRn incluso a pH 5,5 y eluyen en el flujo a través. El anticuerpo de tipo silvestre eluía con un pH cercano al fisiológico ($\text{pH } 7,37 \pm 0,05$), mientras que AAA, LS e YTE, que tienen tasas de disociación más lentas y afinidades de unión a FcRn más fuertes que el tipo silvestre mediante Octet (FIGs. 2B-D) y Biacore™ (FIG. 3), requieren un pH considerablemente mayor para disociarse de la
- 30 columna (AAA: $7,94 \pm 0,06$; LS: $8,29 \pm 0,03$; YTE: $8,14 \pm 0,03$). Los perfiles de elución revelaron que todas las variantes en el banco por combinación requerían un pH más alto para eluir desde la columna de afinidad, que el tipo silvestre. Los cromatogramas representativos con el pH de elución promedio para las variantes únicas (guiones largos intercalados con dos puntos), dobles (guiones largos intercalados con un
- 35 punto), triples (guiones largos) y cuádruples (guiones cortos), se muestran en la FIG. 9A. Las siete variantes iniciales únicas (M252Y, T256D, T256E, T307Q, T307W,

N434F y N434Y) requerían un pH más alto para disociarse de la columna, en comparación con el WT (FIG. 10A, Tabla 3), mientras que aquellas con cinéticas similares al tipo silvestre para hFcRn (K288D/N, Y436H/H/W), todas ellas eluían con un pH similar al tipo silvestre.

5 Tabla 3: Parámetros de caracterización *in vitro* de variantes de anticuerpos iniciales

Variante	Columna de afinidad para FcRn	DSF	Biacore™ pH 6,0					
			hFcRn			rFcRn		
	pH	T _m (°C)	Tasa de asociación (x10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹)	Tasa de disociación (x10 ⁻¹ s ⁻¹)	K _{D,app} (x10 ⁹ M)	Tasa de asociación (x10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹)	Tasa de disociación (x10 ⁻³ s ⁻¹)	K _{D,app} (x10 ⁹ M)
WT	7,37	69,0 ± 0,2	16,2 ± 2,9	3,9 ± 0,4	2380 ± 470	7,3 ± 1,0	15,2 ± 0,2	207 ± 43
E380C	7,18	64,7 ± 0,5	1,7 ± 0,4	4,6 ± 1,5	>10,000	1,7 ± 0,25	106 ± 1	6310 ± 880
K288D	7,33	65,8 ± 0,1	3,3 ± 1,1	5,1 ± 0,8	>10,000	6,6 ± 3,0	8,4 ± 0,6	149 ± 63
K288N	7,39	66,7 ± 0,3	4,1 ± 1,4	4,5 ± 0,3	>10,000	6,4 ± 2,8	10,7 ± 0,9	190 ± 73
M252Y	7,88	64,4 ± 0,2	5,5 ± 1,8	1,4 ± 0,2	3100 ± 1500	10,6 ± 3,1	2,6 ± 0,6	25 ± 3
N434F	8,30	67,8 ± 0,2	35 ± 15	0,5 ± 0,1	165 ± 73	12,6 ± 1,4	3,4 ± 1,8	26 ± 13
N434P	7,56	63,6 ± 0,5	2,4 ± 0,5	3,4 ± 1,1	>10,000	3,4 ± 0,1	6,7 ± 0,2	194 ± 9
N434Y	8,46	67,3 ± 0,5	36 ± 10	0,5 ± 0,1	137 ± 33	14,5 ± 1,8	3,5 ± 1,9	23 ± 12
T256D	7,82	64,7 ± 0,2	4,4 ± 1,7	2,5 ± 0,7	6700 ± 3540	6,1 ± 1,8	4,8 ± 0,1	86 ± 27
T256E	7,63	66,3 ± 0,6	3,9 ± 2,4	3,4 ± 0,2	>10,000	6,3 ± 1,6	6,9 ± 1,0	113 ± 15
T307A	7,61	68,0 ± 0,4	2,9 ± 0,7	2,9 ± 0,5	>10,000	6,1 ± 2,7	7,1 ± 0,7	132 ± 48
T307E	7,58	70,2 ± 0,5	4,4 ± 1,6	3,0 ± 0,4	8130 ± 5070	5,6 ± 2,8	6,0 ± 0,2	141 ± 65
T307F	7,61	70,2 ± 0,3	2,7 ± 0,8	2,9 ± 0,1	>10,000	5,7 ± 2,8	6,2 ± 0,1	131 ± 63
T307M	7,40	70,0 ± 0,4	4,1 ± 0,8	3,9 ± 0,3	>10,000	6,8 ± 2,3	17,1 ± 4,0	279 ± 140
T307Q	7,86	70,3 ± 0,6	4,0 ± 1,1	2,2 ± 0,2	5720 ± 1530	7,4 ± 2,2	4,0 ± 0,3	58 ± 16
T307W	7,75	63,0 ± 0,5	3,3 ± 0,8	2,8 ± 0,3	8740 ± 2440	7,1 ± 2,3	7,4 ± 0,4	111 ± 32
Y436H	7,33	68,7 ± 0,3	2,6 ± 0,8	6,1 ± 1,0	>10,000	5,1 ± 0,1	7,3 ± 0,9	131 ± 9
Y436N	7,22	65,8 ± 0,5	4,6 ± 2,4	7,4 ± 3,3	>10,000	10,1 ± 4,9	20,3 ± 3,1	233 ± 86
Y436W	7,39	68,6 ± 0,7	2,8 ± 1,9	4,6 ± 0,9	>10,000	3,4 ± 2,2	23,7 ± 7,7	1140 ± 950

Todos los datos se obtuvieron utilizando las técnicas experimentales de la parte superior de cada columna. El pH de elución se determinó por cromatografía de afinidad a FcRn por triplicado ($n = 3$) y DSF analizó la estabilidad térmica por triplicado ($n = 3$). Las cinéticas de unión a FcRn para FcRn humano y de rata se obtuvieron mediante Biacore™ con una serie de concentraciones de anticuerpos ($n = 4$) y se ajustaron independientemente. Las unidades para cada medición son las siguientes: pH de elución (unidad-menos); DSF T_m ($^{\circ}\text{C}$); tasa de asociación con Biacore™ a pH 6,0 para hFcRn ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), tasa de disociación ($\times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$) y $K_{D,app}$ ($\times 10^9 \text{ M}$); tasa de asociación con Biacore™ a pH 6,0 para rFcRn ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), tasa de disociación ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) y $K_{D,app}$ ($\times 10^9 \text{ M}$).

Las variantes N434F/Y eluían a un pH mayor que la variante LS (N434F: $8,30 \pm 0,05$; N434Y: $8,46 \pm 0,02$) y mostraban una unión considerable a FcRn a pH 7,4 (Tabla 4). Esos resultados indican que esas variantes solas pueden alterar la dependencia del pH. En general, el pH de elución promedio aumentaba con un aumento del número de mutaciones potenciadoras de la unión a FcRn (FIG. 9B). Aparecía una fuerte correlación ($R^2 = 0,94$) con el pH de elución, en comparación con las tasas de disociación de hFcRn (FIG. 9C); sin estar limitado por ninguna teoría, lo que indica que la alteración de la dependencia del pH de la interacción, contribuye directamente a las tasas de disociación más lentas de FcRn observadas para el banco por combinación a pH 6,0.

Ejemplo 7: Estabilidad térmica

La mayoría de las proteínas, incluyendo los anticuerpos, con una estabilidad termodinámica baja tienen una tendencia incrementada a un plegamiento defectuoso y agregación, y eso limitaría o impediría su actividad, eficacia y potencial como agentes terapéuticos novedosos. La estabilidad térmica de cada variante se determinó utilizando DSF y la temperatura de fusión indicada (T_m) se definió como el punto medio de la primera transición en el perfil de intensidad de la fluorescencia con Sypro™ Orange. En comparación con el WT con una T_m de $69,0 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, la variante LS es similar al WT ($68,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$) y AAA e YTE se desestabilizan térmicamente en $\sim 8^{\circ}\text{C}$ (AAA: $61,3 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$; YTE: $61,2 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$) (FIGs. 8B, 9B y 10B; y Tablas 2B, 3 y 4). En comparación con WT y LS con una T_m de $69,0 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, las variantes AAA e YTE tenían estabilidades térmicas menores en $\sim 8^{\circ}\text{C}$ mediante DSF.

Tabla 4: Parámetros de caracterización *in vitro* de la referencia y combinaciones iniciales

	Columna de afinidad para FcRn	DS F	Biacore™ pH 6,0						Biacore™ pH 7,4		FcγRIIIa V158
			hFcRn			rFcRn			hFcRn	rFcRn	
Variant e	pH	T _m (°C)	Tasa de asociación (x10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹)	Tasa de disociación (x10 ⁻¹ s ⁻¹)	K _{D,app} (x10 ⁹ M)	Tasa de asociación (x10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹)	Tasa de disociación (x10 ⁻³ s ⁻¹)	K _{D,app} (x10 ⁹ M)	UR en estado estacionario	UR en estado estacionario	K _{D,app} (x10 ⁹ M)
WT	7,37	69,0 ± 0,2	16,2 ± 2,9	3,9 ± 0,4	2380 ± 470	7,3 ± 1,0	15,2 ± 0,2	207 ± 43	4,2 ± 0,9	13,0 ± 3,2	467 ± 99
AAA	7,94	61,3 ± 0,6	8,4 ± 1,8	1,4 ± 0,1	1780 ± 380	15,7 ± 3,3	11,7 ± 1,1	77 ± 18	13,9 ± 3,1	23,6 ± 4,9	450 ± 19
LS	8,29	68,5 ± 0,3	19,3 ± 3,5	0,5 ± 0,1	272 ± 40	9,1 ± 1,6	6,6 ± 0,4	74 ± 9	18,3 ± 4,6	24,8 ± 4,8	369 ± 19
YTE	8,14	61,2 ± 0,3	14,3 ± 4,4	0,5 ± 0,1	342 ± 117	6,5 ± 0,5	1,2 ± 0,2	18 ± 2	13,2 ± 3,5	53,9 ± 1,2	1040 ± 160
<u>MDQN</u>	7,92	67,9 ± 0,4	3,8 ± 0,4	8,7 ± 0,1	232 ± 24	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,1	9,5 ± 1,7	10,7 ± 1,0	39,1 ± 4,5	600 ± 4
<u>MDWN</u>	7,92	57,8 ± 0,4	5,3 ± 0,1	8,9 ± 0,3	169 ± 8	1,6 ± 0,1	1,3 ± 0,1	8,2 ± 0,9	12,2 ± 1,3	42,1 ± 4,7	512 ± 30
<u>YDTN</u>	8,29	59,6 ± 0,9	6,3 ± 1,2	5,9 ± 0,20	94 ± 18	2,9 ± 0,1	1,7 ± 0,2	5,9 ± 0,6	9,7 ± 1,8	56,0 ± 5,6	1060 ± 60
<u>YETN</u>	7,83	60,7 ± 0,7	5,9 ± 0,1	7,6 ± 0,3	128 ± 5	3,2 ± 0,1	2,7 ± 0,1	8,4 ± 0,2	9,8 ± 1,2	55,1 ± 6,1	878 ± 101
<u>YTWN</u>	8,14	59,3 ± 0,2	4,8 ± 0,2	5,7 ± 0,1	118 ± 5	2,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	5,2 ± 0,2	15,9 ± 1,7	66,1 ± 7,1	896 ± 53
<u>YDQN</u>	8,51	60,5 ± 0,1	2,5 ± 0,2	2,8 ± 0,1	115 ± 7	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	5,1 ± 0,3	19,8 ± 2,7	65,2 ± 6,6	1060 ± 50
<u>YEQN</u>	8,12	61,9 ± 0,8	1,9 ± 0,1	4,1 ± 0,1	218 ± 6	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	7,8 ± 0,4	15,2 ± 2,1	61,8 ± 6,4	1620 ± 210

Las mutaciones introducidas en la estructura principal de tipo silvestre están subrayadas. Todos los datos se obtuvieron utilizando las técnicas experimentales mostradas en la parte superior de cada columna. El pH de elución y la T_m se

determinaron por triplicado ($n = 3$). Las cinéticas de unión a FcRn para FcRn humano y de rata a pH 6,0, se obtuvieron con Biacore™ ($n = 4$) y se ajustaron independientemente. La respuesta de unión a FcRn en estado estacionario a pH 7,4 se midió utilizando Biacore™ con una concentración de anticuerpo único por triplicado. La afinidad de la unión a FcγRIIIa se determinó a partir de una serie de concentraciones de anticuerpos por duplicado utilizando Biacore™. Las unidades para cada medición son las siguientes: pH de elución (unidad-menos); DSF T_m (°C); tasa de asociación con Biacore™ a pH 6,0 para hFcRn ($\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), tasa de disociación ($\times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) y $K_{D,app}$ ($\times 10^9 \text{ M}$); tasa de asociación con Biacore™ a pH 6,0 para rFcRn ($\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), tasa de disociación ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) y $K_{D,app}$ ($\times 10^9 \text{ M}$); respuesta de unión en estado estacionario (UR) y $K_{D,app}$ de FcγRIIIa ($\times 10^9 \text{ M}$) .

Doce de 18 variantes iniciales por saturación (variantes E380C, M252Y, T256D, T256E, K288N, K288D, N434P, T307A, T307W, Y436H, Y436N, Y436W) tenían una T_m reducida en comparación con el tipo silvestre, y varios de los mutantes T307 (T307E/F/M/Q) mostraban una ligera estabilización (Tabla 4). Ninguna de las siete variantes únicas, utilizadas para las combinaciones (FIG. 10B y Tabla 4) se desestabilizaba significativamente en relación con YTE (FIG. 8B y Tabla 5). La adición de mutaciones dobles (FIG. 9D, líneas horizontales), triples (FIG. 9D, líneas verticales) y cuádruples (FIG. 9D, verificación) en el dominio Fc, conducía a una disminución adicional de la estabilidad térmica global, en comparación con las mutaciones únicas (FIG. 9D, círculos blancos). Múltiples variantes mostraban una T_m menor que AAA o YTE ($61,2 \pm 0,3^\circ\text{C}$) en donde >60% de esas variantes contenían T307W. Las variantes cuádruples (FIG. 9D, verificación) mostraban una distribución bimodal distinta de las temperaturas de fusión, con combinaciones que contenían T307Q que tenían aproximadamente 6°C más de estabilidad térmica que las que poseían T307W (FIG. 9D).

Ejemplo 8: Las variantes de Fc alteran la interacción de la unión a FcγRIIIa

Además de la interacción con FcRn, las regiones Fc de la bisagra y los dominios C_H2 , son responsables de la interacción con otros receptores de Fc, incluyendo FcγRIIIa. Como cinco de las siete variantes únicas utilizadas para la construcción del banco de saturación por combinación se localizan dentro del dominio C_H2 , la capacidad para interaccionar con esos receptores puede estar comprometida en relación con el tipo silvestre, a pesar de su ubicación alejada de la interfaz de interacción. El uso de Biacore™ para medir la unión a FcγRIIIa de una forma similar a la de la unión a FcRn a pH 7,4, revelaba que la variante YTE (FIG.

11A, gris oscura) mostraba una reducción de aproximadamente el 50% en la respuesta de unión, en comparación con el tipo silvestre (FIG. 11A, negro). Sin estar limitada por ninguna teoría, la unión reducida a FcγRIIIa para YTE es un resultado de la mutación M252Y (FIG. 11B, círculo blanco más inferior) ya que esa variante sola tiene una afinidad significativamente disminuida hacia ese receptor. Las otras mutaciones únicas no comparten esa afinidad reducida (FIG. 11B, círculos blancos) y las variantes N434F/Y solo potenciaban la unión en un 16-40%. Esos efectos se transfirieron a la mayoría, pero no todas, de sus combinaciones correspondientes. Por ejemplo, las combinaciones que contenían M252Y tenían una reducción de un 17 y 72% de unión a FcγRIIIa (Tabla 5).

Tabla 5: Concentraciones de las variantes del banco por saturación en medios condicionados

Mutante	Posición										
	M252	I253	S254	T256	K288	T307	K322	E380	L432	N434	Y436
	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)										
A	89,4	3,4	99,5	4,5	106	< 0,1	110	206	173	108	22,0
C	< 0,1	0,2	108	< 0,1	< 0,1	< 0,1	323	< 0,1	138	31,8	< 0,1
D	22,7	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	169	127	133	< 0,1	2,2
E	< 0,1	136	93,0	163	< 0,1	23,5	167	WT	2,7	65,9	8,9
F	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	154	127	118	< 0,1	< 0,1
G	46,7	< 0,1	172	106	< 0,1	4,9	124	146	107	< 0,1	< 0,1
H	< 0,1	< 0,1	< 0,1	207	< 0,1	7,0	229	103	124	< 0,1	173
I	< 0,1	WT	< 0,1	193	53,9	< 0,1	63,0	60,2	182	16,3	< 0,1
K	1,2	4,1	< 0,1	3,2	WT	88,8	WT	69,2	25,0	< 0,1	67,0
L	< 0,1	< 0,1	103	124	< 0,1	< 0,1	181	169	WT	77,7	< 0,1
M	WT	80,0	1,5	122	< 0,1	< 0,1	112	76,8	97,3	30,5	90,1
N	< 0,1	< 0,1	89,6	46,8	< 0,1	126	231	190	235	WT	18,9
P	0,7	< 0,1	18,5	2,7	92,6	< 0,1	1,3	175	< 0,1	120	< 0,1
Q	176	35,7	20,9	123	1,0	14,0	216	197	188	55,4	96,9
R	0,8	< 0,1	< 0,1	189	< 0,1	1,5	209	9,1	142	102	25,0
S	< 0,1	71,1	WT	141	< 0,1	88,8	99,3	153	106	< 0,1	3,0
T	19,7	12,5	< 0,1	WT	83,8	WT	218	176	114	75,2	34,1

Mutante	Posición										
	M252	I253	S254	T256	K288	T307	K322	E380	L432	N434	Y436
	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)										
V	63,6	89,9	67,1	150	< 0,1	< 0,1	88,9	239	114	68,0	18,0
W	2,8	< 0,1	< 0,1	2,9	4,9	< 0,1	66,8	171	< 0,1	21,6	128
Y	0,7	< 0,1	150	117	< 0,1	1,1	143	11,3	26,1	< 0,1	WT

Una variante, MDQE (FIG. 11B, la más elevada en la categoría de variante triple), mostraba un incremento muy fuerte del 140% en la unión a FcγRIIIa. Por tanto, el banco de saturación por combinación ofrecía variantes con una amplia gama de funcionalidades de receptor de Fc que podrían ser útiles para adaptar los anticuerpos terapéuticos con funciones efectoras particulares.

La FIG. 11C muestra un gráfico de cuadros de las respuestas de unión a FcγRIIIa de las siete variantes iniciales únicas, en comparación con las variantes WT e YTE.

10 **Ejemplo 9: Siete combinaciones iniciales equilibran la dependencia del pH de la interacción con FcRn**

Sin estar limitados por ninguna teoría, las variantes candidatas para un estudio adicional *in vivo* ocupan el cuadrante izquierdo inferior de los gráficos mostrados en las FIGs. 7C y 7D. Siete variantes satisfacían esos criterios para hFcRn y comprendían cinco combinaciones dobles y dos triples (MDQN, MDWN, YDTN, YETN, YTWN, YDQN e YEQN) y no contenían una mutación en la posición N434 (Tabla 3). Cada una de esas combinaciones eluía desde la columna de afinidad a FcRn entre AAA (pH $7,94 \pm 0,06$) y LS (pH $8,29 \pm 0,03$), en donde YDQN eluía con el pH más alto de $8,51 \pm 0,14$ (FIG. 12A, Tabla 5), indicando solamente una ligera alteración en la dependencia del pH y una mayor unión residual a pH 7,4 (Tabla 2A). Una de las variantes (MDQN) poseía una estabilidad térmica similar a la del tipo silvestre y seis tenían una T_m similar o reducida en comparación con la variante YTE (FIG. 12B, Tabla 4). En un ensayo de unión a FcγRIIIa, cinco variantes por combinación mostraban una reducción similar a YTE (Tabla 4). Otra investigación con las mutaciones únicas reveló que M252Y afectaba significativamente a la unión de FcγRIIIa y, sin estar limitado por ninguna teoría, ese efecto se traduciría en las combinaciones con esa mutación. Las seis mutaciones únicas restantes eran similares a WT o poseían una unión ligeramente mejorada a ese receptor.

Se seleccionaron tres variantes por combinación para estudios adicionales

basándose en sus propiedades de unión a FcRn, estabilidades térmicas y unión a FcγRIIIa. DQ (T256D/T307Q), DW (T256D/T307W) e YD (M252Y/T256D) proporcionaban cada una unas propiedades de unión a FcRn óptimas (Tabla 2B) como la variante LS (FIG. 12E). Cada variante ofrece un amplio intervalo de estabilidad térmica y propiedades de unión a FcγRIIIa (FIGs. 12F y 12G, Tabla 2B) que proporcionaban un intervalo de funcionalidad. La FIG. 12H es un gráfico de RF con formación de puentes homogéneos.

La mejora de la afinidad de unión aparente para FcRn humano y de rata a pH 6,0, en comparación con las variantes LS (FIG. 13A, guiones largos gruesos) e YTE (FIG. 13B, guiones largos gruesos), respectivamente, era un compromiso entre las tasas de asociación y disociación (FIGs. 13a y 13B, Tabla 4). Típicamente, las combinaciones con tasas de disociación más rápidas también poseen tasas de asociación más rápidas y viceversa. Esta observación se conservaba entre el FcRn humano y de rata (Tabla 4). Además, todas esas variantes tenían una respuesta en estado estacionario más inferior que la variante LS (FIG. 13C, guiones largos gruesos) frente a hFcRn a pH 7,4. Esos resultados no eran compatibles con rFcRn, ya que las cinco variantes que contenían YDTN, YETN, YTWN, YDQN e YEQN, tenían una unión a FcRn elevada a pH 7,4 (Tabla 5), en comparación con YTE. Las variantes MDQN y MDWN eran las únicas combinaciones que tenían reactividad cruzada entre FcRn humano y de rata. Además, esas dos variantes no alteraban la interacción con FcγRIIIa en un grado similar a las variantes que contenían M252Y (FIGs. 12C y 12D y Tabla 5; MDQN: 600 ± 4 nM; MDWN: 512 ± 30 nM; WT: 467 ± 99 nM). De esta manera, la mutagénesis por saturación y combinación en las posiciones clave de la interacción con FcRn, ha conducido a la identificación de variantes iniciales que equilibran la dependencia del pH de la interacción, manteniendo la funcionalidad con un receptor de Fc, lo que podría mejorar la funcionalidad de FcRn *in vivo* y podría prolongar la semivida en suero de los anticuerpos terapéuticos.

Ejemplo 10: Características de unión a factores reumatoides de variantes iniciales por combinación

Se investigó el punto isoeléctrico y la unión a RF de las variantes iniciales, ya que esas mutaciones pueden alterar la carga de la superficie del anticuerpo y la inmunogenicidad. Se ha pensado que los anticuerpos más ácidos prolongan la farmacocinética del anticuerpo. En comparación con WT y los controles LS, los tres candidatos iniciales daban como resultado una reducción de ~0,2 de la unidad de pH en el pI, como resultado de la sustitución T256D. Las mutaciones potenciadoras de FcRn pueden alterar simultáneamente la unión a anticuerpos hospedadores, tales

como el factor reumatoide (RF), debido al solapamiento de las interfases de interacción. Se adaptó un ELISA por formación de puentes homogéneos para medir el cambio en la unión de RF para las variantes iniciales. De forma interesante, LS e YTE mostraban cambios completamente opuestos en la unión de RF, en comparación con WT (FIG. 12H). LS aumentaba significativamente la unión de RF, mientras que YTE mostraba una disminución significativa ($p < 0,001$). YD ($p < 0,001$) y DW ($p < 0,01$) también reducían significativamente la unión de RF, mientras que DQ producía una respuesta similar a WT. Sin estar limitados por ninguna teoría, esos resultados indican que DQ, DW e YD pueden proporcionar una ventaja inmunogénica, en comparación con LS. Las variantes YD, DW y DQ representan una serie de características de anticuerpo clave que pueden ser útiles junto con las propiedades de unión a FcRn mejoradas, sobre las variantes YTE de referencia y LS.

Ejemplo 11: Las variantes iniciales por combinación son transferibles a otros anticuerpos

Se desarrolló un nuevo ensayo de unión utilizando un chip sensor CM5, como se representa en la FIG. 15A. El ensayo de unión incluye una etapa para inmovilizar estreptavidina sobre un chip sensor CM5 para capturar FcRn biotinilado con aproximadamente 30 UR, restituído si es necesario. Se midieron las cinéticas de unión del anticuerpo a pH 6,0 y 7,4, y pH 8,5 para la regeneración. Las FIGs. 15B y 15C muestran la inmovilización directa de FcRn y la captura de estreptavidina del FcRn biotinilado, respectivamente, utilizando el nuevo ensayo de unión.

Unión a FcRn de Mab2 a pH 6,0: con FcRn de ratón, las variantes iniciales de mAb2 muestran tasas de disociación más lentas que la variante LS (guiones) y el tipo silvestre (negro) (FIG. 16A). Para FcRn humano, las variantes iniciales todas tienen tasas de asociación más rápidas pero tasas de disociación similares a LS (guiones) (FIG. 16B).

Unión a FcRn de Mab2 a pH 7,4: todas las variantes iniciales mostraron una unión reducida a FcRn humano a pH 7,4 en comparación con LS (guiones) (FIG. 17A). Como con el fondo mAb1, las variantes DW (MDWN) y DQ (MDQN) también mostraban una unión residual inferior a FcRn de ratón (rata) a pH 7,4 (FIG. 17B).

Las variantes iniciales conservaban una mayor afinidad de unión a pH 6,0 y una menor unión residual a pH 7,4, en comparación con LS (FIG. 18). De manera importante, se encontró que se podían transferir las variantes entre diferentes fondos de IgG1 con poco efecto sobre la unión a FcRn. Como se muestra en la FIG. 19, LS tenía un pH de elución similar independientemente del fondo. WT, DQ y DW en el fondo mAb2 mostraban un pH de elución más alto que en el fondo mAb1,

posiblemente como resultado de una unión más fuerte a pH 6,0 en el fondo mAb2.

Las variantes del fondo MAb2 mostraban todas una estabilidad térmica ligeramente incrementada, como se muestra en la FIG. 20.

Como se muestra en la FIG. 21, de forma similar al fondo MAb1, YD (YDTN) mostraba una reducción en la respuesta de unión a FcγRIIIa (izquierda) y en la afinidad (derecha). DQ (gris claro) y DW (gris oscuro) mostraban propiedades de unión a FcγRIIIa similares a WT (negro) en el fondo MAb2. El efecto sobre la unión a FcγRIIIa para LS es compatible entre MAb1 y mAb2.

De esta manera, las variantes iniciales en el fondo mAb2 no afectan significativamente a la unión a FcRn, la dependencia del pH, la estabilidad térmica o la unión a FcγRIIIa, en comparación con las mismas variantes iniciales en el fondo MAb1.

En una realización, las variantes DQ (T256D/T307Q), DW (T256D/T307W) e YD (M252Y/T256D) se incorporaron en un anticuerpo IgG1 adicional y un fragmento Fc recombinante: mAb2 reconoce un antígeno diferente de mAb1 y mAb3 es un fragmento Fc. En cada caso, las cinéticas de unión a FcRn dependientes del pH (FIG. 22) eran muy similares además del pH de elución, la estabilidad térmica y las afinidades de unión a FcγRIIIa (Tabla 2B y Tabla 6). Sin estar limitados por ninguna teoría, esos resultados indican que las variantes DQ, DW e YD conferían sus propiedades mejoradas de unión a FcRn a proteínas que consistían en un dominio Fc.

Tabla 6: Concentraciones de las variantes del banco por saturación en medios condicionados

Ab	Variante	Columna de afinidad para FcRn	DSF	Biacore™	Biacore™ pH 6,0			Biacore™ pH 7,4		
				FcγRIIIa V158	hFcRn	cFcRn	mFcRn	hFcRn	cFcRn	mFcRn
		pH	T _m	Nº de veces de cambio de la afinidad	*K _{D,app}	*K _{D,app}	*K _{D,app}	UR en estado estacionario	UR en estado estacionario	UR en estado estacionario
2	WT	7,61	69,3 ± 0,1	1,0	678 ± 97	1440 ± 360	107 ± 9	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,3	92 ± 8
2	LS	8,32	69,0 ± 0,1	1,23 ± 0,02	113 ± 22	210 ± 43	20 ± 9	44 ± 4	38 ± 6	285 ± 8

Ab	Variante	Columna de afinidad para FcRn	DSF	Biacore™	Biacore™ pH 6,0			Biacore™ pH 7,4		
				FcyRIIIa V158	hFcRn	cFcRn	mFcRn	hFcRn	cFcRn	mFcRn
		pH	T _m	Nº de veces de cambio de la afinidad	*K _{D,app}	*K _{D,app}	*K _{D,app}	UR en estado estacionario	UR en estado estacionario	UR en estado estacionario
2	DQ	8,06	69,3 ± 0,1	1,05±0,01	97 ± 33	110 ± 42	24 ± 11	14 ± 1	11 ± 1	248 ± 5
2	DW	8,11	58,1 ± 0,1	1,15±0,01	69 ± 25	99 ± 9	13 ± 5	18 ± 2	15 ± 1	257 ± 8
2	YD	8,25	60,5 ± 0,1	0,58±0,01	99 ± 49	120 ± 6	10 ± 3	27 ± 2	22 ± 3	394 ± 11
3	WT	7,62	67,5 ± 0,2	1,0	717 ± 23		61 ± 1	2,2 ± 0,3		72 ± 2
3	LS	8,32	66,6 ± 0,2	1,11±0,03	51 ± 2		16 ± 2	32 ± 2		103 ± 1
3	DQ	8,07	63,8 ± 0,2	0,87±0,02	51 ± 1		24 ± 1	19 ± 2		89 ± 1
3	DW	8,12	57,1 ± 0,2	0,93±0,02	39 ± 6		23 ± 1	22 ± 2		99 ± 1
3	YD	8,23	59,5 ± 0,1	0,73±0,02	54 ± 1		0,5 ± 0,2	28 ± 3		125 ± 2

Ejemplo 12: Las variantes iniciales extendían la semivida de eliminación de anticuerpos en plasma *in vivo*

La farmacocinética (PK) de las variantes DQ, DW e YD se examinó por su efecto sobre la semivida en circulación del anticuerpo con macacos cinomolgos y ratones transgénicos con hFcRn (cepa Tg32) (véase, por ejemplo, Avery et al., *Mabs* (2016) 8: 1064-78) en comparación con los controles WT y LS. Los estudios de unión a FcRn con FcRn de cinomolgo revelaron afinidades de unión similares a hFcRn (FIGs. 23A-23B; Tabla 6). A cada animal se le inyectaron intravenosamente las variantes WT, LS, DQ, DW o YD y la concentración de anticuerpos se cuantificó a través de un enfoque de espectrometría de masas, para determinar la tasa de aclaramiento y la semivida en suero en los macacos (FIG. 24A) y los ratones transgénicos con hFcRn (FIG. 24B). Las tasas de aclaramiento y las semividas en suero se obtuvieron a partir de un modelo no compartimentalizado de la

concentración de anticuerpo como función del tiempo. Las tres variantes iniciales y LS mostraban una tasa de aclaramiento significativamente reducida, en comparación con WT en los macacos y los ratones ($p < 0,001$). La semivida en plasma del anticuerpo WT era de $9,9 \pm 0,5$ y $11,7$ días para los macacos y los ratones, respectivamente. Además, la referencia LS y las variantes identificadas presentaban un aumento significativo de la semivida de eliminación, en comparación con el tipo silvestre en ambas especies (aumento de 2,5 y 1,7 veces en mono y ratón, respectivamente) (Tabla 7). DQ, DW e YD mostraban una prolongación similar de la semivida, en comparación con la referencia LS (Tabla 7). Las mutaciones DQ, DW e YD identificadas en la presente memoria a través de mutagénesis por saturación, mostraban una semivida plasmática significativamente más larga que sus homólogos WT, tanto en modelos animales de primate no humano como de ratón.

Tabla 7: Tasas de aclaramiento y semividas en suero de la referencia y las variantes iniciales

mAb2	Macaco cinomolgo (n = 3)				Ratón Tg32 hFcRn (n = 6)			
	Aclaramiento ($\text{mL día}^{-1} \text{ kg}^{-1}$)	$t_{1/2}$ (días)			Aclaramiento ($\text{mL día}^{-1} \text{ kg}^{-1}$)	$t_{1/2}$ (días)		
Variante	Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD	Nº veces frente a WT	Nº veces frente a LS	Media	Media	Nº veces frente a WT	Nº veces frente a LS
WT	$5,6 \pm 0,5$	$9,9 \pm 0,5$	1,0	0,4	7,4	11,7	1,0	0,6
LS	2,1**	$22,5 \pm 2,4$	2,3	1,0	4,6	19,5	1,7	1,0
DQ	3,4*	20,8	2,1	0,9	3,2	24,5	2,1	1,3
DW	$2,5 \pm 0,2$	$20,4 \pm 0,9$	2,1	0,9	3,5	20,1	1,7	1,0
YD	$2,4 \pm 0,3$	$23,5 \pm 2,1$	2,4	1,0	4,5	17,5	1,5	0,9

15

En la Tabla 7, la tasa de aclaramiento y la semivida en plasma se determinaron utilizando mAb2. Cada tasa de aclaramiento y semivida eran el promedio de $n = 3$ para el macaco cinomolgo y una sola evaluación a partir de un grupo de $n = 6$ ratones transgénicos para hFcRn. El número de veces frente a WT y el número de veces frente a LS muestran la mejora relativa de la semivida en suero, en comparación con WT y LS, respectivamente. * $n = 2$ debido a la formación de ADA, ** $n = 2$ debido a la vía de administración subcutánea parcial.

20

Ejemplo 13: Variantes por combinación con unión mejorada a FcRn a pH 6,0 y pH 7,4

Basándose en la selección con Octet (selección basada en BLI) tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2, se generaron diversas variantes únicas, dobles, triples y cuádruples y se valoró su unión a FcRn a pH 6,0 y pH 7,4 (Tabla 8; los restos sustituidos están subrayados).

Tabla 8: Afinidad de la unión (pH 6,0) y unión en estado estacionario (pH 7,4) de las variantes

Variant e	Tipo	Afinidad de la unión (M ⁻¹)	Afinidad de la unión Error (M ⁻¹)	Unión en estado estacionario , pH 7,4 (UR)	Unión en estado estacionario o Error, pH 7,4 (UR)	Relació n (pH 6,0 / pH 7,4)	Relació n (pH 6,0 / pH 7,4)
WT (MTTN)	Referenci a	420000	83000	4,2	0,9	100000	1,00E-05
AAA	Referenci a	562000	120000	13,9	3,1	40432	2,47E-05
LS	Referenci a	3680000	541000	18,3	4,6	201093	4,97E-06
YTE	Referenci a	2920000	1000000	13,2	3,5	221212	4,52E-06
MDQN	Doble	4310000	446000	10,7	1	402804	2,48E-06
MDTE	Doble	33400000	2240000	29,2	4	1143836	8,74E-07
MDTY	Doble	64100000	2050000	37,1	5	1727763	5,79E-07
MDWN	Doble	5920000	280000	12,2	1,3	485246	2,06E-06
MEQN	Doble	2000000	24100	5,8	0,6	344828	2,90E-06
METE	Doble	12800000	3350000	23,3	3,2	549356	1,82E-06
METY	Doble	16000000	4130000	26,8	3,7	597015	1,68E-06
MEWN	Doble	3100000	259000	7,7	0,9	402597	2,48E-06
MTQE	Doble	23300000	4290000	34,2	4,6	681287	1,47E-06

Variant e	Tipo	Afinidad de la unión (M ⁻¹)	Afinidad de la unión Error (M ⁻¹)	Unión en estado estacionario , pH 7,4 (UR)	Unión en estado estacionari o Error, pH 7,4 (UR)	Relació n (pH 6,0 / pH 7,4)	Relació n (pH 6,0 / pH 7,4)
MTQY	Doble	30900000	6950000	38,4	5,2	804688	1,24E-06
MTWF	Doble	26200000	1230000	30,5	4,2	859016	1,16E-06
MTWY	Doble	46500000	2600000	37,2	4,9	1250000	8,00E-07
YDTN	Doble	10700000	2100000	9,7	1,8	1103093	9,07E-07
YETN	Doble	7810000	305000	9,8	1,2	796939	1,25E-06
YTQN	Doble	3600000	298000	10,6	1,2	339623	2,94E-06
YTTE	Doble	55600000	3090000	43,8	5,8	1269406	7,88E-07
YTTY	Doble	120000000	2890000	54,1	7,1	2218115	4,51E-07
YTWN	Doble	8470000	359000	15,9	1,7	532704	1,88E-06
MDQE	Triple	6620000	1840000	55,3	11,2	119711	8,35E-06
MDQY	Triple	36900000	4360000	49,4	6,7	746964	1,34E-06
MDWF	Triple	28100000	2840000	47,1	6,4	596603	1,68E-06
MDWY	Triple	84000000	9890000	59	7,9	1423729	7,02E-07
MEQE	Triple	142000	6490	8,6	0,8	16512	6,06E-05
MEQY	Triple	23800000	2660000	38,6	5,2	616580	1,62E-06
MEWF	Triple	56200000	8520000	41,9	5,6	1341289	7,46E-07
MEWY	Triple	70400000	7440000	46,6	6,3	1510730	6,62E-07
YDQN	Triple	8700000	560000	19,8	2,7	439394	2,28E-06

Variant e	Tipo	Afinidad de la unión (M ⁻¹)	Afinidad de la unión Error (M ⁻¹)	Unión en estado estacionario , pH 7,4 (UR)	Unión en estado estacionari o Error, pH 7,4 (UR)	Relació n (pH 6,0 / pH 7,4)	Relació n (pH 6,0 / pH 7,4)
<u>YDTE</u>	Triple	29600000	2540000	57,7	7,7	512998	1,95E- 06
<u>YDTY</u>	Triple	90100000	812000	65,4	8,9	137767 6	7,26E- 07
<u>YDWN</u>	Triple	10100000	1540000	25,9	3,6	389961	2,56E- 06
<u>YEQN</u>	Triple	4590000	126000	15,2	2,1	301974	3,31E- 06
<u>YETY</u>	Triple	33400000	3580000	22,6	2,9	147787 6	6,77E- 07
<u>YEWN</u>	Triple	6410000	904000	69,6	9,3	92098	1,09E- 05
<u>YTQE</u>	Triple	56500000	1280000	59,9	8	943239	1,06E- 06
<u>YTQY</u>	Triple	63300000	4010000	71,5	9,6	885315	1,13E- 06
<u>YTWE</u>	Triple	65400000	2990000	62,6	8,2	104472 8	9,57E- 07
<u>YTWY</u>	Triple	10600000 0	1060000 0	75,1	9,8	141145 1	7,08E- 07
<u>YDQE</u>	Cuádruple	11100000 0	4320000	68,6	10	161807 6	6,18E- 07
<u>YDQY</u>	Cuádruple	23500000 0	6060000	80,2	12	293017 5	3,41E- 07
<u>YDWF</u>	Cuádruple	16600000 0	3050000	71,8	9,9	231197 8	4,33E- 07
<u>YDWY</u>	Cuádruple	26600000 0	1910000 0	88,5	11,7	300565 0	3,33E- 07

En la Tabla 8, se muestra la afinidad de la unión a FcRn a pH 6,0 y la unión en estado estacionario a FcRn a pH 7,4 para varios mutantes únicos, dobles, triples y cuádruples, así como variantes de referencia (AAA, LS, YTE).

- 5 Esos valores se representan en la FIG. 25. La FIG. 25 muestra una comparación de la afinidad de la unión a pH 6,0 y la UR a pH 7,4. Como se muestra, la variante de referencia LS tiene la afinidad de unión más fuerte a pH 6,0 y la mayor unión residual a pH 7,4 de las variantes de referencia sometidas a ensayo (AAA, LS,

YTE).

Se determinó que varias variantes por combinación mostradas en la FIG. 25 mostraban una afinidad de unión a FcRn mejorada a pH 6,0 y a pH 7,4. Para investigar si alguna de las variantes por combinación mostraba una unión más fuerte que la variante de MST-HN (referida en la presente memoria como la “referencia YTEKF”, que contenía mutaciones en Met252, Ser254, Thr256, His433 y Asn434 a Tyr252, Thr254, Glu256, Lys433 y Phe434) a pH 6,0 y pH 7,4, se llevó a cabo la siguiente metodología. Se realizó una captura de FcRn biotinilado humano y de cinomolgo mediante el método CAPture con biotina (véase la FIG. 26 para un esquema). Para el pH 6,0, se realizó una serie de concentraciones (5 pts) a partir de 1000 nM por duplicado. Para el pH 7,4 y 8,0, se realizó una inyección con una sola concentración (1000 nM) por triplicado, además de una serie de concentraciones a partir de 1000 nM por duplicado. Los experimentos a pH 7,4 y 8,0 se realizaron con un nivel de captura de FcRn que se incrementó 10 veces en comparación con el pH 6,0, para observar la unión a ese pH. Para el pH 9,0, se realizó una inyección de una sola concentración (1000 nM) por triplicado. Los experimentos a pH 9,0 se realizaron con un nivel de captura de FcRn que se incrementó 100 veces en comparación con pH 6,0, para observar la unión a ese pH. Para el pH 6,0, se realizó una serie de concentraciones (5 pts) a partir de 1000 nM por duplicado. Para el pH 7,4, se llevó a cabo la inyección de una sola concentración (1000 nM) por triplicado (el nivel de captura de cada FcRn se incrementó 10 veces para observar la unión a ese pH). Asociación: 180 segundos; Disociación: 300 segundos.

En las FIGs. 27A-G se muestran sensogramas de la cinética de unión a FcRn humano y cyno a pH 6,0 (Humano: FIG. 27A, Cyno: FIG. 27B), pH 7,4 (Humano: FIG. 27C, Cyno: FIG. 27D) y pH 8,0 (Humano: FIG. 27E, Cyno: FIG. 27F) del tipo silvestre, la referencia YTEKF y 10 variantes por combinación de antagonistas de FcRn. Todas las variantes examinadas mostraban una afinidad que era dos órdenes de magnitud más fuerte tanto para FcRn humano como cyno, en comparación con el WT a pH 6,0 y las cinéticas observables a pH superior. Las variantes examinadas son 6 combinaciones cuádruples (YDQF, YDQY, YDWF, YDWY, YEQY e YEWY), tres triples (MDWY, YDTY, YTWY) y una doble (YY), debido a sus afinidades mejoradas hacia FcRn (Tabla 8). Dos variantes cuádruples adicionales, YEQF e YEWF (FIG. 27G) no se seleccionaron como resultado de las afinidades más débiles hacia FcRn humano y de rata.

Las FIGs. 28A-H y 29A-H muestran las cinéticas de unión a FcRn humano y cyno de las 10 variantes de antagonistas de FcRn (línea negra continua), en

comparación con la referencia YTEKF (línea punteada) y WT (línea de guiones). En las FIGs. 28A y 29A, ocho de las 10 variantes mostraban tasas de disociación más lentas que la referencia YTEKF y tenían tasas de asociación similares a pH 6,0 a las de FcRn humano y cyno (Tablas 9 y 10). Todas las variantes muestran una unión a FcRn significativa tanto a FcRn humano (FIG. 28B y 28D) como a cyno (FIG. 29C y 29D) a pH 7,4 y pH 8,0 (Tablas 9 y 10). Cinco variantes cuádruples YDQF, YDQY, YDWY, YEQY e YEWY, mostraban mayor señal de unión que la referencia YTEKF, una indicación de la afinidad mejorada a ese pH. La normalización de los sensogramas a pH 7,4 (FIGs. 28C y 29C) y a pH 8,0 (FIGs. 28E y 29E) para FcRn humano y cyno, respectivamente, indicaba que esas cinco variantes presentan una unión a FcRn significativa a esos pHs con tasas de disociación más lentas que la referencia YTEKF. En las FIGs. 28F y 29F, el pH 9,0 reducía la unión de FcRn humano y cyno a niveles similares a la variante WT e YTEKF. Las FIGs. 28G y 29G muestran gráficos de isoafinidad con los tres pHs (pH 6,0, negro; pH 7,4, gris oscuro; pH 8,0, gris) para la unión a FcRn humano (FIG. 28G) y cyno (FIG. 29G), en comparación con la referencia YTEKF (cuadrado blanco) y WT (negro, solo pH 6,0). Las variantes de referencia YTEKF e iniciales por combinación tienen una afinidad de unión que es 2-3 órdenes de magnitud mayor que WT a pH 6,0. La afinidad de la unión a FcRn disminuía a medida que aumentaba el pH y las variantes de referencia y por combinación presentaban afinidades similares con todos los pHs examinados. Tres variantes, YDQY, YDWY e YEWY, mostraban mayor unión a FcRn humano y cyno con todos los pHs (Tablas 9 y 10). Una comparación de la afinidad de la unión a FcRn humano (FIG. 28H) y cyno (FIG. 29H) como una función del pH, indicaba una disminución de 10 veces de la afinidad hacia FcRn por unidad de pH para todas las variantes por combinación examinadas.

En las FIG. 33 y FIG. 34, se muestra la tasa de asociación, la tasa de disociación, la afinidad de la unión y la unión en estado estacionario a FcRn humano (FIG. 33) y cyno (FIG. 34) a pH 6,0, 7,4, 8,0 y 9,0 de las variantes por combinación seleccionadas, la referencia YTEKF y el WT. No se reportan niveles de unión en estado estacionario a pH 6,0 ya que todas las variantes muestran cinéticas de unión medibles (tasa de asociación, tasa de disociación y afinidad de la unión) a ese pH. Debido a la afinidad de unión a FcRn significativamente reducida de todas las variantes a pH 9,0, solo se muestra el nivel de unión en estado estacionario como una medida de la unión residual a ese pH. Las mutaciones insertadas están en negrita y subrayadas en la secuencia de WT (MTTN: M252/T256/T307/N434). Por ejemplo: MDWY contenía la mutación T256D/T307W/N434Y y el resto WT en la

posición 252.

Otros parámetros de caracterización de las variantes de antagonistas de FcRn, la referencia YETK y WT, p. ej., la unión a FcγRIIIa, la estabilidad térmica y el pH de elución se determinaron y se muestran en la Tabla 9. Las mutaciones insertadas están en negrita y subrayadas en la secuencia de WT (MTTN: M252/T256/T307/N434). Por ejemplo: **MDWY** contenía la mutación T256D/T307W/N434Y y el resto WT en la posición 252.

Tabla 9: Parámetros de caracterización *in vitro* de variantes de Fc

Dominio Fc	Unión a FcγRIIIa	DSF	Cromatografía por afinidad a FcRn
	UR en estado estacionario	T _m (°C)	pH
WT	195 ± 10	69,4 ± 0,2	7,37 ± 0,05
YTEKF	207 ± 15	59,8 ± 0,1	N.P.
<u>MDWY</u>	211 ± 4	55,4 ± 0,2	8,80 ± 0,03
<u>YDQF</u>	203 ± 18	59,7 ± 0,2	8,88 ± 0,07
<u>YDQY</u>	225 ± 21	59,4 ± 0,3	9,21 ± 0,03
<u>YDTY</u>	146 ± 12	52,1 ± 0,2	8,95 ± 0,01
<u>YDWF</u>	128 ± 6	52,0 ± 0,1	9,18 ± 0,02
<u>YDWY</u>	136 ± 2	58,7 ± 0,1	9,51 ± 0,01
<u>YEQF</u>	226 ± 26	59,8 ± 0,2	9,08 ± 0,01
<u>YEQY</u>	131 ± 9	52,3 ± 0,1	9,25 ± 0,03
<u>YEWY</u>	163 ± 22	56,3 ± 0,2	8,95 ± 0,02
<u>YEWY</u>	146 ± 19	62,3 ± 0,1	9,33 ± 0,08

10

Como se muestra en la Tabla 9, todos los antagonistas de FcRn se desestabilizaban térmicamente a un pH significativamente más alto desde una columna de FcRn, en comparación con el WT. La unión a FcγRIIIa era altamente variable con una unión en estado estacionario similar o reducida, en comparación con el WT. Las mutaciones insertadas están en negrita y subrayadas en la secuencia de WT (MTTN: M252/T256/T307/N434). Por ejemplo: MDWY contenía la mutación T256D/T307W/N434Y y el resto WT en la posición 252.

15

Ejemplo 14: Los antagonistas de FcRn mejoran la degradación de IgG

Los antagonistas de FcRn se coadministraron con IgG humana para determinar el agotamiento de IgG. Los experimentos se realizan utilizando ratones transgénicos homocigotos para FcRn humano (Tg32; por ejemplo, Jackson Laboratory nº de lote 14565, genotipo M01), que permiten predecir a escala para la cinética humana.

El efecto de un antagonista de FcRn (por ejemplo, cualquiera de las variantes cuádruples expuestas en las FIGs. 33 y 34; por ejemplo, YDQY, YEWY, YESQY, YDQF e YDWY) sobre los niveles de IgG en suero, se determina en ratones Tg32. A los ratones Tg32 se les administran 5 mg/kg de una IgG1 humana no direccionada, mediante inyección de bolo intravenoso. Seis horas después, se administra a los ratones una IgG1 humana que comprende un antagonista de FcRn (por ejemplo, como se expone en las FIGs. 33 y 34; por ejemplo, YDQY, YEWY, YEQY, YDQF e YDWY) o un anticuerpo direccionado que comprende un antagonista de FcRn (por ejemplo, como se expone en las FIGs. 33 y 34; por ejemplo, YDQY, YEWY, YEQY, YDQF e YDWY) o un control de vehículo. Se administra a los animales de acuerdo con la pauta de dosificación establecida en la Tabla 10.

Tabla 10: Pauta de dosificación

Grupo	Biomediciones [†]	IgG1 humana que comprende un antagonista de FcRn	Anticuerpo direccionado que comprende un antagonista de FcRn	IgG1 humana no direccionada
Grupo 1 (n=3)	Antag + murAlb + murIgG		20 mg/kg @ t=6	Vehículo @ t=0
Grupo 2 (n=3)	hIgG		Vehículo @ t=6	5 mg/kg @ t= 0
Grupo 3 (n=6)	Antag + hIgG + murAlb + murIgG		10 mg/kg @ t=6 h	5 mg/kg @ t= 0
Grupo 4 (n=6)	Antag + hIgG + murAlb + murIgG		20 mg/kg @ t=6 h	5 mg/kg @ t= 0
Grupo 5 (n=6)	Antag + hIgG + murAlb + murIgG		40 mg/kg @ t=6 h	5 mg/kg @ t= 0
Grupo 6 (n=6)	Antag + hIgG + murAlb + murIgG		20 mg/kg @ t=6, 24, 48 h	5 mg/kg @ t= 0
Grupo 7 (n=6)	Antag + hIgG + murAlb + murIgG	20 mg/kg @ t=6 h		5 mg/kg @ t= 0
Estimación de proteínas (mg)*		3,6	24,6	4,8

*el total de proteínas se estima asumiendo 25 g de peso corporal para un ratón

†las biomediciones incluyen cada una de las IgG1 antagonistas de FcRn (Antag; IgG1 humana y anticuerpo direccionado que comprende una variante cuádruple), IgG1 humana no direccionada (hIgG), IgG endógena de ratón (murlgG) y seroalbúmina de ratón (murAlb)

- 5 Se toman muestras de sangre de acuerdo con la pauta de sangrado establecida en la Tabla 11. Los niveles de cada una de las IgG1 antagonistas de FcRn (FcRn-A; IgG1 humana y anticuerpo direccionado que comprende una variante cuádruple), IgG1 humana no direccionada (hIgG), IgG de ratón endógena (murlgG) y seroalbúmina de ratón (murAlb), se determinan con metodologías de LC-MS/MS y
- 10 ELISA cuantitativas.

Tabla 11: Pauta de sangrado

Grupo	ID*	Pre-dosis	5 min	2 h	6 h	6,5 h	10 h	24 h	48 h	96 h	168 h
1	1-3				15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
2	4-6	40 µl	40 µl					40 µl	CP		
	7-9			40 µl	40 µl					CP	
	10-12					40 µl	40 µl				CP
3	13-15	40 µl	40 µl					40 µl	CP		
	16-18			40 µl	40 µl					CP	
	19-21					40 µl	40 µl				CP
4	22-24	40 µl	40 µl					40 µl	CP		
	25-27			40 µl	40 µl					CP	
	28-30					40 µl	40 µl				CP
5	31-33	40 µl	40 µl					40 µl	CP		
	34-36			40 µl	40 µl					CP	
	37-39					40 µl	40 µl				CP
6	40-42	40 µl	40 µl					40 µl	CP		
	43-45			40 µl	40 µl					CP	
	46-48					40 µl	40 µl				CP
7	49-51	40 µl	40 µl					40 µl	CP		
	52-54			40 µl	40 µl					CP	
	55-57					40 µl	40 µl				CP

*valor identificador de ratón; µl de sangrados no son mortales; CP = punción cardiaca mortal

Ejemplo 15: El antagonista de FcRn mejora la degradación de IgG

- 15 Este Ejemplo describe un estudio que muestra que un antagonista de FcRn a modo de ejemplo, mejora el aclaramiento de IgG coadministrada. En este estudio, se administró mAb1 YDQY (variante de hIgG1) con mAb1 de tipo silvestre, a ratones

transgénicos homocigotos para hFcRn (Tg32; Jackson Laboratory nº de lote 14565, genotipo M01), lo que permite predicciones a escala de seres humanos para las cinéticas. Como parte del estudio, se obtuvieron mediciones PK para YDQY hIgG1 y WT hIgG1. Las mediciones de la albúmina confirmarán además que la inhibición de FcRn no interfiere con el sitio de unión a albúmina.

Más específicamente, se administraron 5 mg/kg de WT hIgG1 (“IgG rastreadora”) a los ratones Tg32 mediante inyección de bolo intravenoso. Seis horas después, o bien YTEKF hIgG1 (ABDEG™) o YDQY hIgG1 se administraron a los ratones de acuerdo con la pauta de dosificación establecida en la Tabla 12. Todas las dosis se administraron con un volumen de dosificación de 10 mL/kg.

Tabla 12: Pauta de dosificación y mediciones PK

	Biomediciones	YTEKF hIgG1	YDQY hIgG1	WT IgG1
Pauta de dosificación				
Grupo 1 (n=3)	murAlb + murIgG	-	20 mg/kg @ t=6	Vehículo @ t=0
Grupo 2 (n=3)	WT hIgG	-	Vehículo @ t=6	5 mg/kg @ t= 0
Grupo 3 (n=9)	YDQY + WT hIgG + murAlb + murIgG	-	10 mg/kg @ t=6 h	5 mg/kg @ t= 0
Grupo 4 (n=9)	YDQY + WT hIgG + murAlb + murIgG	-	20 mg/kg @ t=6 h	5 mg/kg @ t= 0
Grupo 5 (n=9)	YDQY + WT hIgG + murAlb + murIgG	-	40 mg/kg @ t=6 h	5 mg/kg @ t= 0
Grupo 6 (n=9)	YDQY +WT hIgG + murAlb + murIgG	-	20 mg/kg @ t=6, 24, 48 h	5 mg/kg @ t= 0
Grupo 7 (n=9)	YTEKF + WT hIgG + murAlb + murIgG	20 mg/kg @ t=6 h	-	5 mg/kg @ t= 0

Los datos muestran que tres dosis de 20 mg/kg de YDQY hIgG1 (a las 6, 24 y 48 horas) reducían significativamente la concentración de WT hIgG1 rastreadora (Grupo 6; FIGs. 30A y 30B; Tabla 13) y proporcionaron resultados significativamente mejores que YTEKF hIgG1. Las dosis únicas de YDQY hIgG1 o YTEKF hIgG1 no parecían causar una disminución fuerte de la WT IgG rastreadora (FIG. 30C; Tabla 13).

Tabla 13: Aclaramiento de WT hIgG

Grupo	Tratamiento	WT IgG AUC _{last} (0-168 horas) (ug*h/mL)	Nº de veces de disminución de WT
2	WT	7677	--
3	WT+YDQY 10 mg/kg	7101	0,93

4	WT+YDQY 20 mg/kg	7386	0,96
5	WT+YDQY 40 mg/kg	6792	0,88
6	WT+ 3x YDQY 20 mg/kg	4852	0,63
7	WT+YTEKF 20 mg/kg	7648	1,00

- El aclaramiento de YDQY hIgG1 (aproximadamente 2,6 mL/h/kg) era más rápido que el de una IgG típica (~ 0,1-1,0 mL/h/kg) o YTEKF hIgG (~ 1,1 mL/h/kg) en ratones Tg32 (FIGs. 31A y 31B), pero se mantenía una exposición a lo largo de toda la duración del estudio. Los resultados muestran que ese antagonista de FcRn puede permanecer en el hospedador durante un período de tiempo suficiente para reducir el reciclado mediado por FcRn, de WT IgG y favorecer el aclaramiento de WT IgG.