



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112013030352-2 B1



(22) Data do Depósito: 01/06/2012

(45) Data de Concessão: 19/05/2020

(54) Título: ANTICORPO ANTI-FCRN ISOLADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE COMPREENDE O DITO ANTICORPO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR, CÉLULA E USO TERAPÊUTICO DO DITO ANTICORPO

(51) Int.Cl.: A61K 39/395; C07H 21/04; C07K 16/00.

(30) Prioridade Unionista: 02/06/2011 US 61/492,617; 17/06/2011 US 61/498,266.

(73) Titular(es): DYAX CORP..

(72) Inventor(es): DANIEL J. SEXTON; CHRISTOPHER TENHOOR; MALINI VISWANATHAN.

(86) Pedido PCT: PCT US2012040409 de 01/06/2012

(87) Publicação PCT: WO 2012/167039 de 06/12/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 26/11/2013

(57) Resumo: ANTICORPO ANTI-FCRN ISOLADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE COMPREENDE O DITO ANTICORPO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR, CÉLULA E USO TERAPÊUTICO DO DITO ANTICORPO A presente invenção relaciona-se a anticorpos que se ligam a um FcRn e métodos de uso desses anticorpos.

“ANTICORPO ANTI-FCRN ISOLADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE COMPREENDE O DITO ANTICORPO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR, CÉLULA E USO TERAPÊUTICO DO DITO ANTICORPO”

PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica anterioridade sob 35 U.S.C. § 119 para o Pedido Provisório dos Estados Unidos provisória N° 61/492.617, depositado em 2 de junho de 2011, e o Pedido Provisório N° 61/498.266, depositado em 17 de junho de 2011. Todo o conteúdo de ambos os pedidos provisórios são incorporados em sua totalidade a este documento por referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] O campo da invenção se refere a proteínas que ligam o receptor Fc.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[003] O isotipo do anticorpo mais abundante no soro é IgG e tem um papel fundamental na mediação da proteção contra agentes patogênicos, bem como na mediação de respostas alérgicas e inflamatórias que aceleram o recrutamento dos componentes do sistema imunológico para os tecidos, mucosa e superfícies dérmicas (Junghans, Immunologic Research 16(1):29 (1997)). Além disso, também é um componente chave de uma variedade de doenças autoimunes. Em condições normais, a meia-vida de IgG no soro está na faixa de 5-7 dias em camundongos e dias 22 e 23 em seres humanos, o que é um período prolongado, em relação à meia-vida do soro de outras proteínas do plasma. Em parte, isso ocorre porque o receptor FcRn neonatal (FcRn) resgata IgG que passaram por pinocitose de lisossomos degradativos e o recicla para o compartimento extracelular (Junghans and Anderson, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 93:5512 (1996), Roopenian et al. J. Immunology 170:3528 (2003)).

[004] FcRn se liga à porção Fc de IgG. A interação entre a região Fc de IgG e FcRn é dependente do pH. Com a entrada em células por endocitose de fase

fluida, a IgG é sequestrada em endossomos e se liga a FcRn com alta afinidade em pH ácido (6-6,5); quando o complexo IgG-FcRn ciclar para a membrana plasmática, a IgG se dissocia rapidamente de FcRn na corrente sanguínea em pH ligeiramente básico (-7,4). Por este mecanismo de reciclagem mediada por receptor, FcRn efetivamente resgata a IgG de degradação nos lisossomos, prolongando assim a meia-vida de IgG em circulação.

[005] FcRn é um heterodímero não covalente que normalmente reside nos endossomos de células endoteliais e epiteliais. É um receptor ligado por membrana com uma transmembrana de passagem única tendo três domínios alfa de cadeia pesada ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) e um domínio de $\beta 2$ -microglobulina ($\beta 2M$) de única cadeia leve solúvel. Estruturalmente, ele pertence a uma família de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe 1 que tem $\beta 2M$ como uma cadeia leve comum. O FcRn uma cadeia é uma proteína kD 46 composta por um domínio extracelular contendo os domínios de cadeia pesada $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, uma região transmembrana e uma cauda citoplasmática relativamente curta (Burmeister et al. *Nature* 372:366 (1994)).

[006] FcRn foi identificado primeiramente em intestino de ratos neonatos, onde funciona para mediar a absorção de anticorpos IgG do leite materno e facilita seu transporte para o sistema circulatório (Leach et al. *J Immunol* 157:3317 (1996)). FcRn também foi solado da placenta humana, onde também medeia a absorção e transporte de IgG materna para a circulação fetal. Em adultos, FcRn é expresso em vários tecidos, incluindo tecidos epiteliais do pulmão, intestino, rim, bem como nasal, vaginal e superfícies da árvore biliar (Patente US Nº 6.030.613 e 6.086.875; Israel et al. *Immunology* 92:69 (1997); Kobayashi et al. *Am J Physiol* (2002); *Renal Physiol* 282:F358 (2002)).

[007] A fim de estudar as contribuições de FcRn para homeostase de IgG, camundongos foram projetados de modo que ao menos parte dos genes codificando

cadeias pesadas $\beta 2M$ e FcRn foi "retirada" para que estas proteínas não fossem expressadas (WO 02/43658; Junghans and Anderson, Proc Natl Acad Sci US 93:5512 (1996)). Nestes camundongos, a meia-vida do soro e concentrações de IgG foram drasticamente reduzidas, sugerindo um mecanismo dependente de FcRn para homeostase de IgG.

[008] Também foi sugerido que os anticorpos FcRn anti-humanos podem ser gerados em tais camundongos knockout para FcRn e que tais anticorpos podem impedir a ligação de IgG a FcRn. No entanto, tais anticorpos não foram gerados ou testados (WO 43658/02).

[009] A inibição da ligação de IgG com FcRn altera negativamente a meia-vida do soro de IgG, impedindo a reciclagem de IgG. Constatou-se que este princípio é terapeuticamente eficaz em um modelo de camundongo de doenças cutâneas bolhosas autoimunes (Li et al. J Clin Invest 115:3440-3450 (2005)). Nesse sentido, os agentes que bloqueiam ou antagonizam a ligação de IgG com FcRn podem ser usados em um método para tratar ou prevenir doenças autoimunes e inflamatórias ou distúrbios caracterizados pela presença de anticorpos IgG regulados inadequadamente. Um anticorpo monoclonal (mAb) anti-rato FcRn antagonista IG3 impediu com sucesso Miastenia Gravis Autoimune Experimental (MGAE) em um modelo de rato passivo na dose de 30 mg/kg; isso é cerca de 100 vezes menor do que a IgG (IVIG) intravenosa utilizada no tratamento de MG, LES e PTI. Além disso, camundongos deficientes em FcRn geneticamente predispostos a desenvolver doença autoimune como o lúpus ou artrite têm significativa redução na severidade da doença.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0010] A presente divulgação fornece anticorpos isolados que ligam o receptor humano de Fc, ácidos nucleicos codificando tais anticorpos e métodos de usar estes anticorpos para detectar a presença de FcRn, modular a atividade de

receptores Fc e tratar doenças autoimunes.

[0011] Nesse sentido, um aspecto da presente divulgação apresenta um anticorpo isolado que se liga a FcRn humano. Este anticorpo anti-FcRn compreende uma região variável da cadeia leve (V_L) que inclui uma região CDR1 da V_L , CDR2 da V_L e CDR3 da V_L , em que a região CDR3 da V_L tem pelo menos 85% (por exemplo, 90% ou 95%) de homologia com a região CDR3 da V_L de SSYAGSGIYV (SEQ ID N°: 12) ou ASYAGSGIYV (SEQ ID N°: 13). Opcionalmente, CDR1 da V_L e CDR2 da V_L do anticorpo anti-FcRn têm pelo menos 85% (por exemplo, pelo menos, 90% ou 95%) de homologia com a região de CDR1 da V_L de TGTGSDVGSYNLVS (SEQ ID N°: 14) e região CDR2 da V_L de GDSQRPS (SEQ ID N°: 15), respectivamente. O anticorpo anti-FcRn não tem uma cisteína na primeira posição de pelo menos uma região CDR3, por exemplo, pelo menos, uma das regiões CDR3 da V_L .

[0012] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-FcRn descrito acima compreende uma CDR1 da V_L tendo pelo menos 90% de homologia com TGTGSDVGSYNLVS (SEQ ID N°: 14), uma CDR2 da V_L com pelo menos 90% de homologia com GDSQRPS (SEQ ID N°: 15), e/ou uma CDR3 da V_L com pelo menos 90% de homologia com SSYAGSGIYV (SEQ ID N°: 12) ou ASYAGSGIYV (SEQ ID N°: 13). Em um exemplo, o anticorpo anti-FcRn compreende a região CDR1 da V_L de TGTGSDVGSYNLVS (SEQ ID N°: 14), a região V_L de CDR2 GDSQRPS (SEQ ID N°: 15), e/ou região CDR3 da V_L de SSYAGSGIYV (SEQ ID não: 12) ou ASYAGSGIYV (SEQ ID N°: 13).

[0013] Em outras modalidades, o anticorpo anti-FcRn isolado divulgado neste documento compreende uma V_L que compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 85% (por exemplo, pelo menos 90%, 95% ou 98%) de homologia com a SEQ ID N°: 10 ou SEQ ID N°: 11. Em um exemplo, a V_L do anticorpo isolado compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 10 ou

SEQ ID N°: 11.

[0014] Outro aspecto da presente divulgação inclui um anticorpo anti-FcRn isolado que compreende uma região variável de cadeia leve (V_L) que compreende uma região CDR1 da V_L , uma CDR2 da V_L e CDR3 da V_L , em que a região CDR3 da V_L tem até 3 substituições de aminoácidos em comparação com a seguinte sequência: SSYAGSGIYV (SEQ ID N°: 12) ou ASYAGSGIYV (SEQ ID N°: 13), e em que o anticorpo isolado não tem uma cisteína na primeira posição de pelo menos uma região CDR3, por exemplo, pelo menos, uma das regiões CDR3 da V_L . Opcionalmente, a CDR1 da V_L , CDR2 da V_L e CDR3 da V_L do anticorpo anti-FcRn, coletivamente, contêm até 10 substituições de aminoácidos em comparação com as seguintes sequências

(a) CDR1: TGTGSDVGSYNLVS (SEQ ID N°: 14)

(b) CDR2: GDSQRPS (SEQ ID N°: 15)

(c) CDR3: SSYAGSGIYV (SEQ ID N°: 12), ou ASYAGSGIYV (SEQ ID N°: 13).

[0015] Qualquer um dos anticorpos anti-FcRn descritos acima podem compreender ainda uma região variável de cadeia pesada (V_H) que compreende uma CDR1 da V_H , uma CDR2 da V_H e uma CDR3 da V_H , em que a CDR3 da V_H tem pelo menos 85% (por exemplo, pelo menos, 90% ou 95%) de homologia com LAIGDSY (SEQ ID N°: 24). Opcionalmente, a CDR1 da V_H e CDR2 da V_H do anticorpo anti-FcRn têm pelo menos 85% (por exemplo, pelo menos, 90% ou 95%) de homologia com EYAMG (SEQ ID N°: 22) e SIGSSGGQTKYADSVKG (SEQ ID N°: 23), respectivamente.

[0016] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-FcRn compreende uma CDR1 da V_H tendo pelo menos 90% de homologia com EYAMG (SEQ ID N°: 22), uma CDR2 da V_H tem pelo menos 90% de homologia com SIGSSGGQTKYADSVKG (SEQ ID N°: 23), e/ou uma CDR3 da V_H tem pelo menos

90% de homologia com LAIGDSY (SEQ ID N°: 24). Em um exemplo, o anticorpo anti-FcRn compreende a região CDR1 da V_H de EYAMG (SEQ ID N°: 22), a região CDR2 da V_H de SIGSSGGQTKYADSVKG (SEQ ID N°: 23), e/ou região CDR3 da V_H de LAIGDSY (SEQ ID N°: 24).

[0017] Em outras modalidades, o anticorpo anti-FcRn isolado divulgado neste documento compreende uma V_H que compartilha pelo menos 85% (por exemplo, pelo menos 90%, 95% ou 98%) de identidade de sequência com a SEQ ID N°: 9. Em um exemplo, a V_H do anticorpo isolado compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 9.

[0018] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um anticorpo anti-FcRn isolado compreendendo uma cadeia pesada que compreende uma região variável da cadeia pesada (V_H) e uma região constante da cadeia pesada, em que a V_H compreende uma região CDR3 tendo pelo menos 85% (por exemplo, pelo menos, 90% ou 95%) de homologia com LAIGDSY (SEQ ID N°: 24) e a região constante tem uma deleção na posição correspondente ao resíduo de lisina C-terminal da SEQ ID N°: 17. Em alguns exemplos, a variável da cadeia pesada deste anticorpo anti-FcRn compreende ainda uma CDR1 da V_H e uma CDR2 da V_H, que têm pelo menos 85% (por exemplo, pelo menos, 90% ou 95%) de homologia com EYAMG (SEQ ID N°: 22) e SIGSSGGQTKYADSVKG (SEQ ID N°: 23), respectivamente. Em outros exemplos, região constante da cadeia pesada do anticorpo anti-FcRn compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 26.

[0019] O anticorpo anti-FcRn acima descrito pode ainda compreender uma região variável de cadeia leve (V_L) que compreende uma CDR3 da V_L pelo menos 85% (por exemplo, pelo menos, 90% ou 95%) idêntica à de DX-2504 (CSYAGSGIYV; SEQ ID N°: 25) e, opcionalmente, uma CDR1 da V_L pelo menos 85% (por exemplo, pelo menos 90% ou 95%) idêntica a TGTGSDVGSYNLVS (SEQ ID N°: 14) e uma CDR2 da V_L pelo menos 85% (por exemplo, pelo menos 90% ou

95%) idêntica a GDSQRPS (SEQ ID N°: 15). Em um exemplo, o anticorpo anti-FcRn compreende a região CDR1 da V_L de TGTGSDVGSYNLVS (SEQ ID N°: 14), a região V_L de CDR2 GDSQRPS (SEQ ID N°: 15), e/ou região CDR3 da V_L de CSYAGSGIYV (SEQ ID N°:25), SSYAGSGIYV (SEQ ID N°: 12) ou ASYAGSGIYV (SEQ ID N°: 13). Em outro exemplo, a V_L do anticorpo anti-FcRn compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 10, ou SEQ ID N°: 11.

[0020] Qualquer um dos anticorpos anti-FcRn descritos acima pode ligar FcRn humano a uma constante de dissociação (K_D) de menos de 10 nM. Os anticorpos anti-FcRn fornecidos na presente divulgação podem ser humanos ou anticorpos humanizados, ou não imunogênicos em um ser humano. Por exemplo, eles podem compreender uma região de *framework* de anticorpo humano. Alternativamente, os anticorpos anti-FcRn podem ser anticorpos murinos. Em outros exemplos, podem ser anticorpos quiméricos.

[0021] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-FcRn aqui fornecidos são anticorpos de comprimento completo (compreendendo um domínio Fc). Alternativamente, eles podem ser fragmentos ligantes de antígeno tais como Fab, F(ab)², Fv, ou ScFv. Quando desejado, os anticorpos anti-FcRn são anticorpos monoclonais.

[0022] Também são divulgados neste documento (i) uma composição farmacêutica compreendendo qualquer um dos anticorpos aqui descritos e um veículo farmacêuticamente aceitável, (ii) um ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência que codifica qualquer um dos anticorpos fornecidos neste documento, (iii) um vetor compreendendo qualquer um dos ácidos nucleicos que compreendem uma sequência que codifica qualquer um dos anticorpos fornecidos neste documento, e (iv) uma célula hospedeira compreendendo o vetor que compreende qualquer um dos ácidos nucleicos compreendendo uma sequência que codifica qualquer um dos anticorpos fornecidos neste documento.

[0023] Qualquer um dos anticorpos anti-FcRn aqui descritos pode ser usado para detectar a presença de um FcRn ou modular a atividade de um FcRn, tanto *in vivo* ou *in vitro*.

[0024] Em um aspecto, é fornecido aqui um método de detectar um FcRn em uma amostra, o método compreendendo: colocar a amostra em contato com qualquer um dos anticorpos fornecidos neste documento e detectar uma interação entre o anticorpo e o FcRn, se presente.

[0025] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece um método de detectar um FcRn em um sujeito, o método compreendendo: administrar ao sujeito qualquer um dos anticorpos fornecidos neste documento, que podem ser conjugados com uma molécula detectável como um marcador de criação de imagem (fluorescente ou radioativa), e detectar uma interação entre o anticorpo e o FcRn, se presente.

[0026] Em ainda outro aspecto, a presente divulgação fornece um método de modular uma atividade de FcRn o método, compreendendo: colocar um FcRn em contato com qualquer um dos anticorpos fornecidos neste documento, modulando, assim, a atividade de FcRn.

[0027] Em um aspecto, a invenção fornece um método de tratamento de um distúrbio autoimune ou de modulação de meia-vida/níveis de IgG em circulação em um sujeito, o método compreendendo: administrar ao sujeito qualquer um dos anticorpos fornecidos neste documento em uma quantidade eficaz para tratar o distúrbio autoimune ou modular a meia-vida/níveis de IgG em circulação no sujeito.

[0028] Também no âmbito da presente divulgação estão (a) composições farmacêuticas para uso na modulação da atividade de um FcRn, modulação de meia-vida/níveis de IgG em circulação e/ou tratamento de um distúrbio autoimune em um sujeito que precise do mesmo, em que as composições

farmacêuticas compreendem, cada uma, um ou mais dos anticorpos anti-FcRn aqui descritos e um veículo farmacêuticamente aceitável, (b) o uso de qualquer um dos anticorpos anti-FcRn descritos aqui para qualquer um dos fins observados, e (c) o uso de qualquer um dos anticorpos anti-FcRn para o fabrico de um medicamento para modular a atividade de FcRn, modular meia-vida/níveis de IgG em circulação e/ou tratar um distúrbio autoimune em um sujeito (por exemplo, um paciente humano).

[0029] Estes e outros aspectos e modalidades da invenção são descritos mais detalhadamente abaixo.

[0030] Cada uma das limitações da invenção pode abranger várias modalidades da invenção. Portanto, prevê-se que cada uma das limitações da invenção envolvendo qualquer elemento ou combinações de elementos pode ser incluída em cada aspecto da invenção. Esta invenção não é limitada em sua aplicação aos detalhes de construção e o arranjo dos componentes estabelecidos na seguinte descrição ou ilustrados nas figuras. A invenção é capaz de possuir outras modalidades e de ser praticada ou ser realizada de várias maneiras. Além disso, a fraseologia e a terminologia usadas neste documento têm fins de descrição e não devem ser consideradas como restritivas. O uso de "incluindo", "compreendendo", ou "tendo", "contendo", "envolvendo" e suas variações no presente documento se destina a englobar os itens listados posteriormente e respectivos equivalentes, bem como itens adicionais.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0031] As figuras são apenas ilustrativas e não são necessárias para a habilitação da invenção divulgada neste documento.

[0032] A Figura 1 mostra uma Análise de Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC) de DX-2504, 532A-X53-C02 e 532A-X54-B03;

A Figura 2 mostra uma análise de SDS-PAGE de DX-2504, 532A-X53-C02 e

532A-X54- B03;

A Figura 3 mostra a estabilidade da temperatura de DX-2504, 532A-X53-C02 e 532A-X54- B03;

A Figura 4 mostra a estabilidade do pH de DX-2504, 532A-X53-C02 e 532A-X54-B03;

A Figura 5 mostra a estabilidade em pH 8,3 de DX-2504, 532A-X53-C02 e 532A-X54- B03;

A Figura 6 mostra a estabilidade para a desnaturação química de DX-2504, 532A-X53-C02 e 532A-X54-B03;

A Figura 7 mostra a análise da cinética da interação de hFcRn em pH6 com DX-2504, 532A-X53-C02 e 532A-X54-B03 imobilizados;

A Figura 8 mostra a análise da cinética da interação de hFcRn em pH 7,5 com DX-2504, 532A-X53-C02 e 532A-X54-B03 imobilizados;

A Figura 9 mostra as sequências de DX2504 (SEQ ID N°: 8), 532A-X53-C02 (SEQ ID N°: 10), e 532A-X54-B03 (SEQ ID N°: 11).

A Figura 10 mostra as distribuições do comprimento de H-CDR3 do anti-hFcRn vs Fab-310.

A Figura 11 mostra dois gráficos que caracterizam algumas das propriedades de proteínas anti-FcRn selecionadas.

A Figura 12 mostra o efeito de anticorpos anti-FcRn sobre o catabolismo de hlgG em TG32B de camundongos.

A Figura 13 mostra as concentrações de soro de DX-2504 e DX-2507 administrado em macacos cynomolgus.

A Figura 14 mostra os níveis de IgG em macacos cynomolgus após a administração de DX-2504 e DX-2507.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0033] São divulgados neste documento anticorpos isolados capazes

de ligação com FcRn humano e seus usos na detecção da presença de FcRn, modulação da atividade de FcRn, regulação de meia-vida/nível de IgGs em circulação e/ou tratamento de distúrbios associados com anormalidade de IgG, tais como distúrbios autoimunes (por exemplo, esclerose múltipla, artrite reumatoide, lúpus, trombocitopenia imune, espondilite anquilosante e pênfigo) e distúrbios inflamatórios, tais como doença inflamatória intestinal. De preferência, tais anticorpos anti-FcRn podem (a) bloquear a ligação da porção de IgG/Fc humana específica com o sítio de interação FcRn-Fc; (b) se ligar a FcRn humano e de rato (solúvel e células); (c) se ligar a FcRn em pH 6; e/ou (d) se ligar não exclusivamente a $\beta 2M$.

[0034] Em circunstâncias normais, FcRn pode prolongar a meia-vida de IgG em circulação. Anticorpos que se ligam ao FcRn podem ser usados para modular a função de FcRn, por exemplo, impedindo a sua interação com IgG. Em especial, os anticorpos que bloqueiam a interação de FcRn com IgG podem ser usados para reduzir a meia-vida de moléculas de IgG.

[0035] Em um aspecto, a divulgação prevê, nomeadamente, anticorpos FcRn anti-humanos antagônicos para humanos que estão disponíveis para o tratamento de distúrbios autoimunes e redução dos níveis de IgGs circulantes. Também são divulgados Fabs solúveis (sFab) de alta afinidade com a capacidade de se ligar através do domínio de ligação do antígeno e bloquear a interação entre IgG-Fc e FcRn humano ou FcRn de rato.

Definições

[0036] O termo "proteína de ligação" se refere a uma proteína que pode interagir com uma molécula alvo.

[0037] Este termo é usado permutavelmente com "ligante". Uma "proteína de ligação do FcRn" ou "ligante de ligação do FcRn" se refere a uma proteína que pode interagir com um FcRn e inclui, em especial, as proteínas que

interagem preferencialmente com um FcRn, por exemplo, IgG.

[0038] Como usado aqui, o termo "anticorpos" se refere a uma proteína que inclui pelo menos um domínio variável de imunoglobulina ou sequência de domínio variável de imunoglobulina. Por exemplo, um anticorpo pode incluir uma região variável da cadeia pesada (H) (abreviado aqui como V_H) e uma região variável da cadeia leve (L) (abreviado aqui como V_L). Em outro exemplo, um anticorpo inclui duas regiões variáveis da cadeia pesada (H) cadeia variável e duas regiões variáveis da cadeia leve (L). O termo "anticorpos" engloba os fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos (por exemplo, anticorpos de cadeia única, fragmentos Fab e sFab, F(ab')₂, fragmentos Fd, fragmentos Fv, scFv e fragmentos dAb), bem como anticorpos completos (anticorpos com comprimento total).

[0039] As regiões V_H e V_L podem ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas "regiões determinantes de complementaridade" ("CDR"), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas "regiões de *framework*" ("FR"). A extensão da região de *framework* e de CDRs foi precisamente definida (ver, Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, and Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917, ver também <http://www.hgmp.mrc.ac.uk>). Definições de Kabat são usadas neste documento. Cada V_H e V_L é tipicamente composta por três CDRs e quatro FRs, dispostas de amino-terminal para carbóxi-terminal na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[0040] O termo "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo de comprimento total (ou simplesmente "porção do anticorpo" ou "fragmento"), como usado aqui, se refere a um ou mais fragmentos de um anticorpo de comprimento total que mantêm a capacidade de se ligar especificamente a um alvo de interesse. Exemplos de fragmentos de ligação englobados pelo termo "fragmento de ligação ao

antígeno" de um anticorpo de comprimento total incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente constituído por domínios de V_L, V_H, C_L e C_HI; (ii) um fragmento F(ab')₂, um fragmento bivalente, incluindo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região da dobradiça (*hinge*); (iii) um fragmento F_d consistindo nos domínios V_H e C_HI; (iv) um fragmento F_v consistindo nos domínios V_L e V_H de um único braço de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste em um domínio V_H; e (vi) uma região determinante de complementaridade (CDR) isolada que mantém a funcionalidade. Além disso, embora os dois domínios do fragmento F_v, V_L e V_H, sejam codificados por genes separados, eles podem ser unidos usando métodos de recombinação, por um ligante sintético que permite que sejam feitos como uma cadeia única de proteína, na qual as regiões V_L e V_H se juntam para formar moléculas monovalentes, conhecidas como F_v de cadeia única (scFv). Veja por exemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; and Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883.

[0041] Fragmentos de anticorpos podem ser obtidos usando qualquer técnica apropriada, incluindo técnicas convencionais conhecidas por aqueles versados na técnica. O termo "anticorpo monoespecífico" se refere a um anticorpo que exibe uma especificidade de ligação única e afinidade para um alvo específico, por exemplo, o epítipo. Este termo inclui um "anticorpo monoclonal" ou "composição de anticorpo monoclonal," que neste documento se referem a uma preparação de anticorpos ou fragmentos do mesmo de única composição molecular. Como usado aqui, "isotipo" se refere à classe de anticorpos (IgM ou IgG) que é codificada por genes de região constante da cadeia pesada.

[0042] Como usado aqui, "afinidade de ligação" se refere à constante de associação aparente ou K_a. O K_a é o recíproco da constante de dissociação (K_d). Uma proteína de ligação pode, por exemplo, ter uma afinidade de ligação de pelo

menos 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} e 10^{-11} M para uma molécula alvo específica. Uma maior afinidade de ligação de um ligante de ligação para um primeiro alvo em relação a um segundo alvo pode ser indicada por uma K_a mais alta (ou K_d com valor numérico menor) para ligar o primeiro alvo do que K_a (ou K_d com valor numérico) para ligar o segundo alvo. Em tais casos, a proteína tem especificidade para o primeiro alvo (por exemplo, uma proteína em uma primeira conformação ou imitação da mesma) em relação ao segundo alvo (por exemplo, a mesma proteína em uma segunda conformação ou imitação da mesma; ou uma segunda proteína). Diferenças na afinidade de ligação (por exemplo, para a especificidade ou outras comparações) podem ser pelo menos 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 50, 70, 80, 100, 500, 1000, ou 10^5 vezes.

[0043] A afinidade de ligação pode ser determinada por uma variedade de métodos, incluindo diálise de equilíbrio, ligação de equilíbrio, filtração de gel, ELISA, ressonância de plasmon de superfície ou espectroscopia (por exemplo, usando um ensaio de fluorescência). Condições exemplares para avaliar a afinidade de ligação estão em PBS (solução salina tamponada com fosfato) em pH 7,2 a 30°C. Estas técnicas podem ser usadas para medir a concentração de proteína ligada e livre como uma função da concentração de proteína (ou alvo) de ligação. A concentração de proteína de ligação ligada ([Ligada]) está relacionada à concentração de proteína de ligação livre ([Livre]) e a concentração de sítios de ligação para a proteína de ligação no alvo onde (N) é o número de sítios de ligação por molécula alvo pela seguinte equação:

$$[\text{Ligada}] = N \cdot [\text{Livre}] / ((1/K_a) + [\text{Livre}]).$$

[0044] Não é sempre necessário fazer uma determinação exata de K_a , embora, já que às vezes isto é suficiente para obter uma medição quantitativa da afinidade, por exemplo, determinada utilizando um método, tal como análise por ELISA ou FACS, é proporcional a K_a e, portanto, pode ser usada para comparações,

tais como determinar se uma maior afinidade é, por exemplo, duas vezes maior, para obter uma medição qualitativa da afinidade, ou para obter uma inferência da afinidade, por exemplo, pela atividade em um ensaio funcional, por exemplo, um ensaio *in vitro* ou *in vivo*.

[0045] O termo "ligante cognato" se refere a um ligante natural de um FcRn, incluindo as respectivas variantes naturais (por exemplo, variantes *splice*, mutantes naturais e isoformas).

[0046] Uma "substituição de aminoácido conservadora" é aquele em que o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral semelhante. As famílias de resíduos de aminoácidos tendo cadeias laterais semelhante foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias de laterais polares sem carga (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais apolares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais ramificadas beta (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (e.g., tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). É possível para muitos resíduos de aminoácidos de *framework* e CDR incluir uma ou mais substituições conservadoras.

[0047] Sequências de consenso para biopolímeros podem incluir posições que podem ser variadas entre vários aminoácidos. Por exemplo, o símbolo "X", neste contexto, geralmente se refere a qualquer aminoácido (por exemplo, qualquer um dos vinte aminoácidos naturais ou qualquer um dos dezenove aminoácidos que não cisteína). Outros aminoácidos permitidos podem também ser indicados, por exemplo, usando parênteses e barras. Por exemplo, "(A/W/F/N/Q)" significa que alanina, triptofano, fenilalanina, asparagina e glutamina são permitidos nessa posição específica.

[0048] Uma região variável de imunoglobulina "efetivamente humana" é uma região variável de imunoglobulina que inclui um número suficiente de posições de *framework* de aminoácido humano tais que a região variável da imunoglobulina não provoca uma resposta imunogênica em um ser humano normal. Um anticorpo "efetivamente humano" é um anticorpo que inclui um número suficiente de posições de aminoácidos humanos tais que o anticorpo não provoca uma resposta imunogênica em um ser humano normal.

[0049] Um "epítopo" se refere ao sítio em um alvo composto que é ligado por uma proteína de ligação (por exemplo, um anticorpo tal como um Fab ou anticorpo de comprimento completo). No caso em que o composto alvo é uma proteína, o sítio pode ser inteiramente composto por componentes de aminoácido, inteiramente composto por modificações químicas dos aminoácidos da proteína (por exemplo, porções de glicosil), ou composto por suas combinações. Epítopos sobrepostos incluem, pelo menos, um resíduo de aminoácido comum.

[0050] Cálculos de "homologia" ou "identidade de sequência" entre duas sequências (os termos são usados permutavelmente neste documento) são realizados da seguinte maneira. As sequências são alinhadas para fins de comparação ideal (por exemplo, lacunas podem ser introduzidas em um ou ambos de uma primeira e uma segunda sequência de aminoácidos ou de ácidos nucleicos para alinhamento ideal e sequências não homólogas podem ser desconsideradas para fins de comparação). O alinhamento ideal é determinado como a melhor pontuação usando o programa GAP do pacote de software GCG com uma matriz de pontuação Blosum 62 com uma penalidade para lacunas de 12, uma penalidade de extensão de lacunas de 4 e uma penalidade de lacuna de janela (*frameshift*) de 5. Os resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos em posições correspondentes de aminoácido ou posições de nucleotídeo são, então, comparados. Quando uma posição na primeira sequência é ocupada pelo mesmo resíduo de aminoácido ou

nucleotídeo que a posição correspondente na segunda sequência, então as moléculas são idênticas naquela posição (como usado aqui, "identidade" de aminoácidos ou de ácidos nucleicos é equivalente a "homologia" de aminoácido ou ácido nucleico). A percentagem de identidade entre as duas sequências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas sequências.

[0051] Em uma modalidade, o comprimento de uma sequência de referência alinhada para fins de comparação é pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, 80%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% ou 100% do comprimento da sequência de referência. Por exemplo, a sequência de referência pode ser o comprimento da sequência de domínio variável de imunoglobulina.

[0052] Uma região variável de imunoglobulina "humanizada" é uma região variável de imunoglobulina que é modificada para incluir um número suficiente de posições de *framework* de aminoácido humano tais que a região variável da imunoglobulina não provoca uma resposta imunogênica em um ser humano normal. Descrições de imunoglobulinas "humanizadas" incluem, por exemplo, US 6.407.213 e US 5.693.762.

[0053] Como usado aqui, o termo "hibridiza em condições de rigor baixo, rigor médio, rigor elevado ou rigor muito elevado" descreve condições para hibridização e lavagem. Orientação para a realização de reações de hibridização pode ser encontrada em Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6, que é incorporado por referência. Métodos aquosos e não aquosos são descritos em tal referência e também podem ser usados. Condições específicas de hibridização referidas neste documento são as seguintes: (1) condições de hibridização de rigor baixo em 6X cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) a cerca de 45°C, seguida por duas lavagens em 0,2X SSC, 0,1% SDS pelo menos a 50°C (a temperatura das lavagens pode ser aumentada para 55°C para condições

de rigor baixo); (2) condições de hibridação de rigor médio em 6X SSC a cerca de 45°C, seguida por uma ou mais lavagens em 0,2X SSC, 0,1% SDS a 60°C; (3) condições de hibridação de rigor elevado em 6X SSC a cerca de 45°C, seguida de uma ou mais lavagens em 0,2X SSC, 0,1% SDS a 65°C; e (4) condições de hibridização de rigor muito elevado são 0,5 M de fosfato de sódio, 7% SDS a 65°C, seguida de uma ou mais lavagens em 0,2X SSC, 1% SDS a 65°C. Condições de rigor muito elevado (4) são as condições preferenciais e as que devem ser usadas, salvo especificação em contrário. A divulgação inclui ácidos nucleicos que hibridizam com rigor baixo, médio, elevado, ou muito elevado para um ácido nucleico aqui descrito ou para um complemento, por exemplo, ácidos nucleicos codificando uma proteína de ligação aqui descritos. Os ácidos nucleicos podem ter o mesmo comprimento ou 30, 20, ou 10% do comprimento do ácido nucleico de referência. O ácido nucleico pode corresponder a uma região codificando uma sequência de domínio variável de imunoglobulina.

[0054] Uma proteína de ligação de FcRn pode ter mutações (por exemplo, pelo menos uma, duas, ou quatro, e/ou menos de 15, 10, 5 ou 3) em relação a uma proteína de ligação aqui descrita (por exemplo, substituições conservadoras ou não essenciais de aminoácidos), que não tem um efeito substancial sobre as funções da proteína. Se uma substituição especial será tolerada ou não, ou seja, não vai afetar adversamente as propriedades biológicas, tais como a atividade de ligação, pode ser previsto, por exemplo, usando o método de Bowie, et al. (1990) Science 247: 1306-1310.

[0055] Um "domínio imunoglobulina" se refere a um domínio do domínio variável ou constante das moléculas de imunoglobulina. Domínios imunoglobulina normalmente contêm duas folhas β , formadas por cerca de sete filamentos β e uma ligação dissulfeto conservada (ver, por exemplo, A. F. Williams and A. N. Barclay 1988 Ann. Rev Immunol. 6:381-405).

[0056] Como usado aqui, uma "sequência de domínio variável de imunoglobulina" se refere a uma sequência de aminoácidos que pode formar a estrutura de um domínio variável de imunoglobulina, de modo que uma ou mais regiões CDR são posicionadas em uma conformação apropriada para um sítio de ligação ao antígeno. Por exemplo, a sequência pode incluir toda ou parte da sequência de aminoácidos de um domínio variável natural. Por exemplo, a sequência pode omitir um, dois ou mais aminoácidos N- ou C-terminal, aminoácidos internos, pode incluir uma ou mais inserções ou aminoácidos terminais adicionais ou pode incluir outras alterações. Em uma modalidade, um polipeptídeo que inclui a sequência de domínio variável de imunoglobulina pode se associar com outra sequência de domínio variável de imunoglobulina para formar uma estrutura de ligação alvo (ou "sítio de ligação ao antígeno"), por exemplo, uma estrutura que preferencialmente interage com uma estrutura FcRn.

[0057] A cadeia V_H ou V_L do anticorpo mais pode incluir toda ou parte de uma região constante de cadeia leve ou pesada para, assim, formar uma cadeia pesada ou leve da imunoglobulina, respectivamente. Em uma modalidade, o anticorpo é um tetrâmero de duas cadeias pesadas da imunoglobulina e duas cadeias leves da imunoglobulina, em que as cadeias pesadas e leves da imunoglobulina são interligadas por, por exemplo, ligações dissulfeto. A região constante da cadeia pesada inclui três domínios, C_{H1}, C_{H2} e C_{H3}. A região constante da cadeia leve inclui um domínio CL. A região variável das cadeias pesadas e leves contém um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos normalmente mediam a ligação do anticorpo a fatores ou tecidos hospedeiros, incluindo várias células do sistema imunológico (por exemplo, células efectoras) e do primeiro componente (C1q) do sistema complemento clássico. O termo "anticorpo" inclui imunoglobulinas intactas dos tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (bem como os respectivos subtipos). As cadeias leves da imunoglobulina podem ser

dos tipos: capa ou lambda. Em uma modalidade, o anticorpo é glicosilado. Um anticorpo pode ser funcional para citotoxicidade dependente de anticorpo e/ou citotoxicidade mediada por complemento.

[0058] Uma ou mais regiões de um anticorpo podem ser humanas ou efetivamente humanas. Por exemplo, uma ou mais das regiões variáveis podem ser humanas ou efetivamente humanas. Por exemplo, uma ou mais das CDRs podem ser humanas, por exemplo, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, e LC CDR3. Cada uma das CDRs da cadeia leve pode ser humana. HC CDR3 pode ser humana. Uma ou mais das regiões de *framework* podem ser humanas, por exemplo, FR1, FR2, FR3 e FR4 da HC ou LC. Em uma modalidades, todas as regiões de *framework* são humanas, por exemplo, derivadas de uma célula somática humana, por exemplo, uma célula hematopoiética que produz imunoglobulinas ou uma célula não hematopoiética. Em uma modalidade, as sequências humanas são sequências da linha genética, por exemplo, codificadas por um ácido nucleico da linha genética. Uma ou mais regiões constantes podem ser humanas ou efetivamente humanas. Em uma modalidade, pelo menos 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, ou 98%, ou a totalidade, do anticorpo pode ser humano ou efetivamente humano.

[0059] Todo ou parte de um anticorpo pode ser codificado por um gene de imunoglobulina ou um segmento do mesmo. Genes de imunoglobulina humana exemplares incluem os genes região constante capa, lambda, alfa (IgA1 e IgA2), gama (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, épsilon e mu, bem como a miríade de genes da região variável da imunoglobulina. "Cadeias leves" da imunoglobulina de comprimento total (cerca de 25 KDa ou 214 aminoácidos) são codificadas por um gene da região variável no NH₂-terminal (cerca de 110 aminoácidos) e um gene da região constante capa ou lambda para o COOH—terminal. "Cadeias pesadas" da imunoglobulina de comprimento total (cerca de 50 KDa ou 446 aminoácidos) são codificadas da mesma forma por um gene da região variável (cerca de 116

aminoácidos) e um dos outros genes da região constante acima mencionados, por exemplo, gama (codificação de cerca de 330 aminoácidos).

[0060] Uma composição "isolada" se refere a uma composição que é removida de pelo menos 90% de, pelo menos, um componente de uma amostra natural a partir do qual a composição isolada pode ser obtida. Composições produzidas artificialmente ou naturalmente podem ser "composições de pelo menos" um certo grau de pureza se a espécie ou população de espécies de interesses for pelo menos 5, 10, 25, 50, 75, 80, 90, 92, 95, 98 ou 99% pura em uma base massa-massa.

[0061] O termo "imitar", no contexto de uma imitação de uma conformação de um FcRn ou parte do mesmo, se refere a um FcRn modificado, que tem um viés para pelo menos uma conformação particular em relação a um FcRn natural, ou parte dele.

[0062] Um resíduo de aminoácido "não essencial" é um resíduo que pode ser alterado da sequência de tipo selvagem do agente de ligação, por exemplo, o anticorpo, sem abolir ou sem alterar substancialmente uma atividade biológica, considerando que um resíduo de aminoácido "essencial" resulta em tal mudança.

[0063] As frases "administração parenteral" e "administrado(a)(s) parenteralmente", como usadas no presente documento, significam modos de administração que não administração enteral e tópica, geralmente por injeção e incluem, entre outras, injeção e infusão endovenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoide, intraspinal, epidural e intraesternal.

[0064] Os termos "polipeptídeo" ou "peptídeo" (que podem ser usado de forma intercambiável) se referem a um polímero de três ou mais aminoácidos ligados por uma ligação peptídica, por exemplo, entre 3 e 30, 12 e 60, ou 30 e 300

ou mais de 300 aminoácidos de comprimento. O polipeptídeo pode incluir um ou mais aminoácidos não naturais. Normalmente, o polipeptídeo inclui apenas os aminoácidos naturais. Uma "proteína" pode incluir uma ou mais cadeias polipeptídicas. Nesse sentido, o termo "proteína" engloba os polipeptídeos. Uma proteína ou um polipeptídeo também pode incluir uma ou mais modificações, por exemplo, uma glicosilação, amidação, fosforilação, nitrosilação e assim por diante. O termo "pequeno peptídeo" pode ser usado para descrever um polipeptídeo que tem entre 3 e 30 aminoácidos de comprimento, por exemplo, entre 8 e 24 aminoácidos de comprimento.

[0065] Uma "quantidade profilaticamente eficaz" se refere a uma quantidade eficaz, em doses e por períodos de tempo necessários, para atingir o resultado profilático desejado. Normalmente, porque uma dose profilática é usada em sujeitos antes de ou em uma fase inicial da doença, a quantidade profilaticamente eficaz será menor do que a quantidade terapeuticamente eficaz.

[0066] Como usado aqui, o termo "substancialmente idêntico(a)" (ou "substancialmente homólogo(a)") é usado neste documento para se referir a uma primeira sequência de aminoácidos ou de ácidos nucleicos que contém um número suficiente de resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos idênticos ou equivalentes (por exemplo, com uma cadeia lateral semelhante, por exemplo, substituições de aminoácidos conservados) a uma segunda sequência de aminoácido ou ácido nucleico, de modo que a primeiras e a segunda sequência de aminoácidos ou de ácidos nucleicos têm (ou codificam proteínas tendo) atividades similares, por exemplo, uma atividade de ligação, uma preferência de ligação ou uma atividade biológica. No caso de anticorpos, o segundo anticorpo tem a mesma especificidade e tem pelo menos 50% da afinidade em relação ao mesmo antígeno.

[0067] Sequências homólogas ou similares (por exemplo, pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência) às sequências divulgadas neste

documento são também parte desta aplicação. Em algumas modalidades, a identidade de sequência pode ser de cerca de 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou superior. Além disso, a identidade substancial existe quando os segmentos de ácido nucleico se hibridizam sob circunstâncias de hibridação seletivas (por exemplo, condições de hibridização altamente rigorosas), para o complemento do filamento. Os ácidos nucleicos podem estar presentes nas células inteiras, em um lisado celular ou de forma parcialmente purificada ou substancialmente pura.

[0068] A significância estatística pode ser determinada por qualquer método conhecido na técnica. Testes estatísticos exemplares incluem: teste T de Student, teste não paramétrico (*U-test*) de Mann Whitney U e teste estatístico não paramétrico de Wilcoxon. Algumas relações estatisticamente significativas têm um valor de P inferior a 0,05 ou 0,02. Proteínas de ligação específicas podem mostrar uma diferença, por exemplo, na especificidade ou ligação, que são estatisticamente significantes (por exemplo, valor de $P < 0,05$ ou $0,02$). "Os termos "induzir", "inibir", "potenciar", "elevar", "aumentar", "diminuir" ou semelhantes, por exemplo, que denotam diferenças qualitativas ou quantitativas distinguíveis entre dois estados e podem se referir a uma diferença, por exemplo, uma diferença estatisticamente significativa, entre os dois estados.

[0069] Uma "dose terapeuticamente eficaz" modula um parâmetro mensurável, por exemplo, os níveis de anticorpos IgG em circulação por um grau estatisticamente significativo ou pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 60%, ou pelo menos cerca de 80% em relação a sujeitos não tratados. A capacidade de um composto em modular um parâmetro mensurável, por exemplo, autoimunidade, pode ser avaliada em um sistema de modelo animal preditivo da eficácia em doenças autoimunes humanas. Como alternativa, tal propriedade de uma composição pode ser avaliada examinando a capacidade do

composto em modular um parâmetro *in vitro*, por exemplo, pelos ensaios conhecidos por aqueles versados na técnica.

[0070] Outras características e vantagens da presente invenção se tornarão mais evidentes a partir da descrição detalhada e das reivindicações abaixo. Modalidades da invenção podem incluir qualquer combinação das características descritas neste documento. Em caso algum o termo "modalidade" exclui uma ou mais de outras características divulgadas neste documento.

Sequências FcRn

[0071] O alinhamento de sequência a seguir é de uma sequência de aminoácidos de cadeia alfa FcRn humana com uma sequência de aminoácidos de cadeia alfa FcRn de rato. Uma proteína FcRn exemplar pode incluir estas duas sequências, ou um fragmento das mesmas, por exemplo, um fragmento sem a sequência sinal:

	domínio α_1	domínio α_2
α _HUMANO	YNSLRGEAEPCGAWVWENQVSWYWEKETD ¹ DLRIKEKLFLEAFKALGGK--GP	YTLQLLG
α _RATO:	YNNLRQEADPCGAWIWENQVSWYWEKETD ¹ DLKSKEQLFLEAIRTLENQINGT	FTLQLLG

	Sequência sinal	domínio α_1
α _HUMANO :	MGVPRPQPWALGLLLFLLPGSLG	AESHLSLLYHLTAVSSPAPGTPAFWVSGWLGPQQYLS
α _RATO:	MGMSQPGV-LLSLLLVLLPQTWG	AEPRLPLMYHLAAVSDLSTGLPSFWATGWLGAQQYLT

domínio α_2

α _HUMANO : CELGPDNTSVPTAKFALNGEEFMNFDLKQGTWGGDWPEALAI SQRWQQDKAANKELTFL

α _RATO : CELAPDNSSLPTAVFALNGEEFMRFNPRGTGNWSGEWPETDIVGNLWMKQPEAARKESEFL

domínio α_2 domínio α_3

α _HUMANO : LFSCPHRLREHLERGRGNLEWK EPPSMRLKARPSSPGFSVLTCsafsfypPELQLRFLRN

α _RATO : LTSCPERLLGHLERGRQNLEWK EPPSMRLKARPGNSGSSVLTCaafsfypPELKFRFLRN

domínio α_3

α _HUMANO : GLAAGTGQDFGPNSDGsfHASSSLTVKSGDEHHYCCIVQHAGLAQPLRVELE

α _RATO : GLASGSGNCSTGPNNGDsfHAWSLLEVkrGDEHHYQCQVEHEGLAQPLTVLDL

Transmembrana

Domínio citoplasmático

α _HUMANO : SPAKSSVLVVGIVIGVLLLLTAAAVGGALLW RRMRSGLPAPWISLRGDDTGVLLPTPGEAQ

α _RATO : SPARSSVPVVGIIIGLLLLVVVAIAGGVLLW NRMRSGLPAPWLSLSGDDSGDLLPGGNLPP

α _HUMANO : DADLKDVNVIPATA (SEQ ID NO:1)

α _RATO : EAEPQGVNAFPATS (SEQ ID NO:2)

[0072] O alinhamento de sequência a seguir é de uma sequência de aminoácidos da β_2 microglobulina humana com uma sequência de aminoácidos da β_2 microglobulina do rato. Uma proteína FcRn exemplar pode incluir estas duas sequências, ou um fragmento das mesmas, por exemplo, um fragmento sem a sequência sinal:

Sequência sinal

 β_2 microglobulina

β_2m_humana : **MSRSVALAVLALLSLSGLEA** IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLL

β_2m_rato : **MARSVTVIFLVLVSLAVVLA** IQKTPQIQVYSRHPPENGKPNFLNCYVSQFHPPQIEIELL

 β_2 microglobulina

β_2m_humana : KNGERIEKVEHSDLSFSKDWsfYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTLsqPKIVKWRDRM (SEQ ID NO:3)

β_2m_rato : KNGKKIPNIEMSDLSFSKDWsfYILAHEFTPTETDvyACRVKHVTLKEPKTVTWRDRM (SEQ ID NO:4)

[0073] Uma sequência de exemplar do ácido nucleico codificando uma

cadeia alfa de proteína FcRn pode incluir as seguintes sequências:

Sequência de nucleotídeos alfa FcRn (*Homo sapiens*):

GTTCCTCAGGTACGAGGAGGGCATTGTTGTCAGTCTGGACCGAGCCCGCAGAGCCCCTCCTCGGCGTCCT
GGTCCCGGCCGTGCCCGCGGTGTCCCGGGAGGAAGGGGCGGGCCGGGGTTCGGGAGGAGTACGTGCCCC
CTCCCGCCCCAGGTCTCCTCTCAGCATGGGGTCCCGCGGCCCTCAGCCCTGGGCGCTGGGGCTCCTGCT
CTTTCCTTCTGGGAGCCTGGGCGCAGAAAGCCACCTCTCCCTCCTGTACCACCTTACCGCGGTGTCC
TCGCTGCCCGGGGACTCCTGCCTTCTGGGTGTCCGGCTGGCTGGGCCCGCAGCAGTACCTGAGCTACA
ATAGCTGCGGGGCGAGGCGGAGCCCTGTGGAGCTTGGGTCTGGGAAAACCAGGTGTCTGGTATTGGGA
GAAAGAGACCACAGATCTGAGGATCAAGGAGAAGCTCTTTCGAAAGCTTTCAAAAGCTTTGGGGGAAAA
GGTCCCTACACTCTGCAGGGCCTGCTGGGCTGTGAACTGGGCCCTGACAACACCTCGGTGCCACCGCCA
AGTTCGCCCTGAACGGCGAGGAGTTCATGAATTTTCGACCTCAAGCAGGGCACCTGGGGTGGGGACTGGCC
CGAGGCCCTGGCTATCAGTCAGCGGTGGCAGCAGCAGGACAAGGCGCCAACAAGGAGCTCACCTTCTG
CTATTCTCCTGCCCGCACCGCCTGCGGGAGCACCTGGAGAGGGGCCGCGGAAACCTGGAGTGGAAAGGAGC
CCCCCTCCATGCGCCTGAAGGCCCGACCCAGCAGCCCTGGCTTTTCCGTGCTTACCTGCAGCGCCTTCTC
CTTCTACCCTCCGGAGCTGCAACTTCGGTTTCTGCGGAAATGGGCTGGCCGCTGGCACCGGCCAGGGTGAC
TTCGGCCCCAACAGTGACGGATCCTTCCACGCCTCGTCGTCACTAACAGTCAAAAAGTGGCGATGAGCACC
ACTACTGCTGCATTGTGCAGCACGCGGGGCTGGCGCAGCCCCCTCAGGGTGGAGCTGGAATCTCCAGCCAA
GTCTCCGTGCTCGTGGTGGGAATCGTCATCGGTGTCTTGTACTCACGGCAGCGGCTGTAGGAGGAGCT
CTGTTGTGGAGAAGGATGAGGAGTGGGCTGCCAGCCCCCTGGATCTCCCTTCGTGGAGACGACACCGGGG
TCTCTGCCCACCCAGGGGAGGCCAGGATGCTGATTTGAAGGATGTAATGTGATTCCAGCCACCGC
CTGACCATCCGCCATTCCGACTGCTAAAAGCGAATGTAGTCAGGCCCTTTCATGCTGTGAGACCTCCTG
GAACACTGGCATCTCTGAGCCTCCAGAAGGGTCTTGGCCCTAGTTGTCTCCTCCTCTGGAGCCCCGTCT
GTGGTCTGCCCTCAGTTTCCCCTCCTAATACATATGGCTGTTTTCCACCTCGATAATATAACACGAGTTTG
GGCCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO:5)

[0074] A sequência de ácido nucleico de um FcRn humano exemplar (domínio extracelular) mais sequências de DNA de GPI (letras minúsculas em **negrito**) é definida abaixo.

ATGGGGTCCCGCGCCCTCAGCCCTGGGCGCTGGGGCTCCTGCTCTTTCTCCTTCTGGGAGCCTGGGCG
CAGAAAGCCACCTCTCCCTCCTGTACCACCTTACCGCGGTGTCTCGCTGCCCGGGGACTCCTGCCTT
CTGGGTGTCCGGCTGGCTGGGCCCGCAGCAGTACCTGAGCTACAATAGCCTGCGGGGCGAGGCGGAGCC
TGTGGAGCTTGGGTCTGGGAAAACCAGGTGTCTGGTATTGGGAGAAAAGAGACCACAGATCTGAGGATCAA
GGAGAAGCTCTTTTCGAAAGCTTTCAAAAGCTTTGGGGGAAAAAGGTCCCTACACTCTGCAGGGCCTGCTGG
GCTGTGAACTGGGCCCTGACAACACCTCGGTGCCACCGCCAAGTTCGCCCTGAACGGCGAGGAGTTCATG
AATTTTCGACCTCAAGCAGGGCACCTGGGGTGGGGACTGGCCCGAGGCCCTGGCTATCAGTCAGCGGTGGCA
GCAGCAGGACAAGGCGGCCAACAAGGAGCTCACCTTCTGCTATTCTCCTGCCCGCACCGCCTGCGGGAGC
ACCTGGAGAGGGGCCGCGGAAACCTGGAGTGGAAAGGAGCCCCCTCCATGCGCCTGAAGGCCCGACCCAGC
AGCCCTGGCTTTTCCGTGCTTACCTGCAGCGCCTTCTCCTTCTACCCCTCCGGAGCTGCAACTTCGGTTCT
GCGGAAATGGGCTGGCCGCTGGCACCGGCCAGGGTGACTTCGGCCCCAACAGTGACGGATCCTTCCACGCCT
CGTCGTCACTAACAGTCAAAAAGTGGCGATGAGCACCCTACTGCTGCATTGTGCAGCACGCGGGGCTGGCG
CAGCCCCCTCAGGGTGGAGCTGGAATCTCCAGCCAAGTCTCC**cgccgctcgacgggctacgagcatcagt**
aactactaggcgcaggcctactactatcactactaccagcactactacgatttggccataa (SEQ ID
NO:6)

[0075] Uma sequência exemplar do ácido nucleico codificando uma Beta-2-microglobulina (β 2M) pode incluir as seguintes sequências:

Beta-2-microglobulina (B2M) nucleotídeo (*Homo sapiens*):

AATATAAGTGGAGGCGTCGCGCTGGCGGGCATTCTGAAGCTGACAGCATTGGGGCCGAGATGTCTCGCT
 CCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCTATCCAGCGTACTCCAAAGAT
 TCAGGTTTACTCACGTCATCCAGCAGAGAATGGAAAGTCAAATTTCTGAATTGCTATGTGTCTGGGTTT
 CATCCATCCGACATTGAAGTTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAGAATTGAAAAAGTGGAGCATTGAGACT
 TGTCTTTGAGCAAGGACTGGTCTTTCTATCTCTTGTACTTACTGAATTCACCCCACTGAAAAAGATGA
 GTATGCCTGCCGTGTGAACCATGTGACTTTGTGCACAGCCCAAGATAGTTAAGTGGGATCGAGACATGTAA
 GCAGCATCATGGAGGTTTGAAGATGCCGCATTTGGATTGGATGAATTCCAAATTCGCTTGCTTGCTTTT
 TAAATATTGATATGCTTATACACTTACACTTTATGCACAAAATGTAGGGTTATAATAATGTTAACATGGAC
 ATGATCTTCTTTATAAATCTACTTTGAGTGCTGTCTCCATGTTTATGATGTATCTGAGCAGGTTGCTCCACA
 GGTAGCTCTAGGAGGGCTGGCAACTTAGAGGTGGGGAGCAGAGAATTCCTTATCCAACATCAACATCTT
 GGTCAGATTTGAACTCTTCAATCTCTTGCCTCAAAGCTTGTAAAGATAGTTAAGCGTGCATAAGTTAAC
 TTCCAATTTACATACTCTGCTTAGAATTTGGGGGAAAATTTAGAAATATAATTGACAGGATTATTGGAAA
 TTTGTTATAATGAATGAAACATTTGTGCATATAAGATTCATATTTACTTCTTATAACATTTGATAAAGTAA
 GGCATGGTTGTGGTTAAATCTGGTTTATTTTTGTTCCACAAGTTAAATAAATCATAAACTTGATGTGTTA
 TCTCTTA (SEQ ID NO: 7)

Anticorpos de ligação de FcRn

[0076] DX2504 é um anticorpo de ligação de FcRn que é descrito em WO2009/131702 e US-2009-0324614-A1. Tanto WO2009/131702, quanto US-2009-0324614-A1 são incorporadas em sua totalidade a este pedido por referência. DX2504 foi gerada por uma combinação de tecnologia anticorpo monoclonal e experimentos *phage display* usando polipeptídeos FcRn ou células expressando FcRn como o alvo. Além disso, a sequência de DX2504 foi colocada em uma de linha genética para reduzir imunogenicidade. As sequências de cadeia de leve e pesada DX2504 são mostradas abaixo:

Região Variável da Cadeia Leve (SEQ ID N°: 8):

FR1-L	CDR1-L	FR2-L	CDR2-L
QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTGSDVGSYNLVS	WYQQHPGKAPKLMYI	GDSQRPS
FR3-L	CDR3-L	FR4-L	
GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	CSYAGSGIYV	FGTGTKVTVL	

Comprimento Total da Cadeia Leve (SEQ ID N°: 16; C_L sublinhada):

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTGSDVGSYNLVSQHPGKAPKLMYIGDSQRPSGVSNRFSGSKSGNTASL
TISGLQAEDEADYYCCSYAGSGIYVFGTGKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV
AWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Região Variável da Cadeia Pesada (SEQ ID N°: 9):

FR1-H CDR1-H FR2-H CDR2-H
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS EYAMG WVRQAPGKGLEWVS SIGSSGGQTKYADSVKG
FR3-H CDR3-H FR4-H
RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR LAIGDSY WGQGTMTVTVSS

Comprimento Total da Cadeia Pesada (SEQ ID N°: 17; C_H sublinhada):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEYAMGWVRQAPGKGLEWVSSIGSSGGQTKYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARLAIGDSYWGQGTMTVTVSSASTKGPVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTC
PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0077] Foi constatado que, além de ligar FcRn, DX2504, ou anticorpos precursores, bloqueia a ligação de IgG-Fc com células expressando FcRn (Exemplo 21 de WO2009/131702). Além disso, a administração de DX2504 para camundongos Tg32B, um camundongo em que o FcRn de camundongo é substituído por FcRn humano, reduziu os níveis de uma IgG humana que foi anteriormente administrada aos camundongos (Exemplo 27 de WO2009/131702). Além disso, a administração de DX2504 em macacos cynomolgus resultou na redução dos níveis de soro de IgG (Exemplo 27 de WO2009/131702).

[0078] Foi inesperadamente constatado neste documento que alterar a CDR3 da cadeia leve (por exemplo, os mutantes de cisteína aqui descritos) ou a região constante da cadeia pesada (por exemplo, os mutantes de deleção aqui descritos) de DX2504 resultou em anticorpos de ligação de FcRn com propriedades melhoradas em relação a DX2504. Esse achado foi inesperado, pelo menos em parte, porque, geralmente, um anticorpo que passou por tantas rodadas de

otimização de sequência, tais como DX2504, não pode ser facilmente otimizado ainda mais com a introdução de mutações adicionais.

Mutantes de Cisteína

[0079] Os mutantes de cisteína de DX2504 aqui descritos não possuem um resíduo de cisteína na primeira posição de pelo menos uma CDR3, por exemplo, a primeira posição da CDR3 da V_L de DX2504 sendo substituída por outro resíduo de aminoácido como Ala, Ser ou uma substituição conservadora do mesmo. Mutantes de cisteína exemplares incluem, entre outros, 532A-X 53-C02 (tendo uma V_L estabelecida como SEQ ID N°: 10) e 532A-X 53-B03 (tendo uma V_L estabelecida como SEQ ID N°: 11). Tais mutantes preservam a atividade de ligação de FcRn, por exemplo, se ligando a FcRn humano com uma constante de dissociação (K_D) inferior a 10 nM, que pode ser determinada por um método de rotina. Em alguns exemplos, o mutante de cisteína contém duas cadeias da V_L, qualquer uma ou ambas as quais não têm uma cisteína na primeira posição da região CDR3 da V_L.

[0080] O mutante de cisteína aqui descrito pode incluir uma cadeia V_L, na qual CDR1, CDR2 e CDR3 compartilham pelo menos 70% (por exemplo, pelo menos 75%, 80%, 85%, 90% ou 95%) da identidade de sequência para CDR1 da V_L e CDR2 da V_L de DX2504 (SEQ ID N°: 14 e 15, respectivamente; idênticas àquelas em 532A-X53-C02 ou 532A-X53-B03) e uma CDR3 da V_L alterada de DX2504 (SEQ ID N°: 12 ou 13, a CDR3 da V_L de 532A-X 53-C02 ou 532A-X 53-B03). Em algumas modalidades, uma ou mais de CDRS da V_L compartilham pelo menos 70% da identidade de sequência que a(s) CDR(s) de 532A-X53-C02 ou 532A-X53-B03 correspondente. Por exemplo, o mutante de cisteína tem pelo menos 70% de homologia (pelo menos 75%, 80%, 85%, 90% ou 95%) na região CDR3 da V_L com as sequências SSYAGSGIYV (SEQ ID N°: 12), ou ASYAGSGIYV (SEQ ID N°: 13).

[0081] Em outras modalidades, as CDRS da V_L do mutante de cisteína, em combinação, compartilham pelo menos 70% da identidade de sequência com as

de 532A-X53-C02 ou 532A-X53-B03, em combinação. Por exemplo, um anticorpo com pelo menos 90% de homologia na região CDR1, CDR2 e CDR3 com as sequências de CDR de referência se refere a um anticorpo que tenha pelo menos 9 de cada 10 aminoácidos nas regiões CDR1, CDR2 e CDR3 combinadas idênticas aos aminoácidos encontrados nas regiões CDR1, CDR2 e CDR3 combinadas de 532A-X 53-C02.

[0082] Alternativamente, o anticorpo pode ter até 1, até 2, até 3, até 4 ou até 5 substituições de aminoácidos na região CDR3 da V_L em comparação com as sequências SSYAGSGIYV (SEQ ID N°: 12) ou ASYAGSGIYV (SEQ ID N°: 13). Em algumas modalidades, o mutante de cisteína pode conter até 3 substituições na região CDR3 da V_L em comparação com a região CDR3 de DX2504. Uma ou mais das substituições de aminoácidos podem ser substituições conservadoras de aminoácidos.

[0083] Além disso, os anticorpos de mutante de cisteína podem ter até 1, até 2, até 3, até 4, até 5, até 6, até 7, até 8, até 9, até 10, ou até 15 substituições de aminoácidos na região CDR1, CDR2 e CDR3 em comparação com as sequências das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de 532A-X53-C02 ou 532A-X53-B03. Em algumas modalidades, eles podem conter até 10 substituições nas regiões CDR1 da V_L, CDR2 e CDR3 coletivamente. Em um exemplo, uma ou mais das substituições de aminoácidos são substituições conservadoras de aminoácidos.

[0084] Em algumas modalidades, o mutante de cisteína compreende uma cadeia da V_L que compartilha pelo menos 70% (por exemplo, pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% ou 98%) identidade de sequência com a sequência V_L de 532A-X53-C02 (SEQ ID N°: 10) ou de 532A-X53-B03 (SEQ ID N°: 11). Em um exemplo, o mutante de cisteína compreende a mesma região CDR3 da V_L que 532A-X 53-C02 ou 532A-X 53-B03 e, opcionalmente, as mesmas regiões CDR1 da V_L e CDR2 que os dois mutantes exemplares.

[0085] A "identidade percentual" de duas sequências de aminoácidos pode ser determinada usando o algoritmo de Karlin e Altschul Proc. Natl. Acad. Set USA 87:2264-68, 1990, modificado conforme em Karlin e Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993. Tal algoritmo é incorporado aos programas NBLAST e XBLAST (versão 2.0) de Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. Pesquisas de proteína BLAST podem ser realizadas com o programa XBLAST, pontuação = 50, tamanho da palavra (*word length*) = 3 para obter sequências de aminoácido homólogas para as moléculas de proteína de interesse. Onde existem lacunas entre duas sequências, Gapped BLAST pode ser utilizado como descrito em Altschul et al, Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997. Ao usar os programas BLAST e Gapped BLAST, os parâmetros padrão dos respectivos programas (por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser usados.

[0086] Em algumas modalidades, os mutantes de cisteína descritos neste documento podem conter uma ou mais mutações (por exemplo, substituições conservadoras de aminoácidos) dentro das regiões de *framework* (FRs) em comparação com os dois mutantes exemplares descritos acima e no Exemplo 1 abaixo. Como conhecido na técnica, é improvável que mutações dentro das regiões de FR afetem a atividade de ligação ao antígeno do anticorpo. Em outras modalidades, os mutantes de cisteína descritos neste documento podem conter uma ou mais mutações (por exemplo, 1, 2 ou 3 mutações tais como substituições conservadoras de aminoácidos) dentro de uma ou mais das regiões CDR em comparação com 532A-X53-C02 ou de 532A-X53-B03. De preferência, esses mutantes retêm as mesmas regiões/resíduos responsáveis pela ligação ao antígeno como a origem, tais como os mesmos resíduos determinantes de especificidade dentro das CDRs.

[0087] Em geral, um resíduo de cisteína fornece uma proteína com propriedades únicas, porque um resíduo de cisteína pode formar uma ligação

covalente com outras cisteínas. A mutação de uma cisteína frequentemente resulta em proteínas com propriedades significativamente alteradas. Portanto, não era esperado que fosse constatado que os anticorpos com a cisteína em CDR3 da cadeia leve que sofreram mutação para qualquer uma serina (C54-C02) ou uma alanina (X54-B03) fossem mais homogêneos do que DX-2504, como medido por análise de cromatografia de exclusão por tamanho (Figura 1) e por SDS-PAGE (Figura 2). Também foi inesperado que mutantes cisteína fossem mais estáveis, no que diz respeito à percentagem de espécies de IgG monoméricas, ao longo de uma incubação de 30 dias a 37°C (Figura 3) ou após uma incubação de 15 dias a pH 8,3 (Figura 4). Mutações nas CDRs de um anticorpo muitas vezes diminuem a afinidade de ligação do antígeno. Foi, portanto, inesperado ainda que a mutação de uma cisteína na CDR3 da cadeia leve de DX-2504 não afetasse a afinidade de ligação ao antígeno (Figuras 7 e 8).

[0088] Qualquer um dos mutantes de cisteína descritos acima pode compreender ainda uma região variável da cadeia pesada (V_H), que compreende as regiões CDR1 da V_H, CDR2 da V_H e CDR3 da V_H. A V_H pode ser a mesma de DX2504 (SEQ ID N°: 9) ou uma variante funcional da mesma. Em algumas modalidades, as CDRS da V_H na variante funcional compartilham pelo menos 70% (por exemplo, pelo menos 75%, 80%, 85%, 90% ou 95%) da identidade de sequência às de DX2504 (SEQ ID N°: 22, 23 e 24). Em um exemplo, uma ou mais das CDRS da V_H compartilha pelo menos 70% da sequência de identidade da(s) CDR(S) da V_H correspondente(s) de DX2504, por exemplo, tendo pelo menos 70% de homologia (pelo menos 75%, 80%, 85%, 90% ou 95%) na região CDR3 da V_H com as sequências LAIGDSY (SEQ ID N°: 24).

[0089] Em outro exemplo, as CDRS da V_H da variante funcional, em combinação, compartilha de pelo menos 70% da identidade de sequência com a de DX2504, em combinação. Por exemplo, um anticorpo com pelo menos 90% de

homologia na região CDR1, CDR2 e CDR3 com as sequências de CDR de referência se refere a um anticorpo que tenha pelo menos 9 de cada 10 aminoácidos nas regiões CDR1, CDR2 e CDR3 combinadas idênticas aos aminoácidos encontrados nas regiões CDR1, CDR2 e CDR3 combinadas de DX2504.

[0090] Como alternativa, o mutante funcional pode conter até 1, até 2, até 3, até 4 ou até 5 substituições de aminoácidos na região CDR3 em comparação com as sequências CDR3 de DX2504 (LAIGDSY; SEQ ID N°: 24). Em algumas modalidades, as variantes funcionais incluem até 3 substituições na região CDR3 da V_H em comparação com a região de CDR3 de DX2504. Em um exemplo, uma ou mais das substituições de aminoácidos são substituições conservadoras de aminoácidos.

[0091] Além disso, a variante funcional pode conter até 1, até 2, até 3, até 4, até 5, até 6, até 7, até 8, até 9, até 10, até 11, até 12, até 12, até 14, ou até 15 substituições de aminoácidos na região CDR1, CDR2 e CDR3 em comparação com as sequências das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de DX2504. Em algumas modalidades, eles podem conter até 10 substituições nas regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de V_H, coletivamente. Em um exemplo, uma ou mais das substituições de aminoácidos são substituições conservadoras de aminoácidos.

[0092] Em algumas modalidades, a variante funcional compreende uma cadeia V_H que compartilha pelo menos 70% (por exemplo, pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% ou 98%) da identidade de sequência com a sequência V_H de DX2504 (SEQ ID N°: 9). Em um exemplo, a variante funcional compreende a mesma região CDR3 da V_H que DX2504 e, opcionalmente, as mesmas regiões CDR1 da V_H e CDR2 que DX2504.

[0093] Quando desejado, a variante funcional da cadeia pesada DX2504, conforme descrito neste documento, pode conter uma ou mais mutações (por exemplo, substituições conservadoras de aminoácidos) dentro das regiões de

framework (FRs) de DX2504 (ver descrição acima). Como conhecido na técnica, é improvável que mutações dentro das regiões de FR afetem a atividade de ligação ao antígeno do anticorpo. Em outras modalidades, os mutantes de cisteína descritos neste documento podem conter uma ou mais mutações (por exemplo, 1, 2 ou 3 mutações tais como substituições conservadoras de aminoácidos) dentro de uma ou mais das regiões CDR em comparação com DX2504. De preferência, tais variantes retêm as mesmas regiões/resíduos responsáveis pela ligação ao antígeno como a origem, tais como os mesmos resíduos determinantes de especificidade dentro das CDRs.

[0094] Em um exemplo, o mutante de cisteína de DX2504 descrito neste documento é composto por uma cadeia leve compreende pelo menos 70% (por exemplo, pelo menos 75%, 80%, 85%, 90% ou 95%) de homologia com 532A-X 53-C02 ou 532A-X 53-B03, e uma cadeia pesada compreendendo as mesmas CDRs que as de DX2504 (por exemplo, a mesma região variável da cadeia pesada que a de DX2504). Em outro exemplo, o mutante compreende a mesma V_L que 532A-X 53-C02 ou 532A-X 53-B03 e a mesma V_H que DX2504.

Mutantes de Deleção

[0095] Também foi descoberto, inesperadamente, que a deleção do resíduo de lisina C-terminal da cadeia pesada de DX2504 resultou em um anticorpo anti-FcRn (DX2507) tendo maior retenção de anticorpo e uma maior redução de IgG em um modelo animal em comparação com DX2504 (Figuras 13 e 14).

[0096] Da mesma forma, são também descritos aqui mutantes de deleção que não possuem o resíduo de lisina C-terminal em sua cadeia pesada em comparação com a cadeia pesada de DX2504. Mais especificamente, a cadeia pesada do mutante de deleção aqui descrito pode ser, de outra forma, idêntica à cadeia pesada de DX2504 (SEQ ID N°: 17) ou à cadeia pesada de qualquer uma das variantes funcionais de DX2504, como descrito acima, exceto para a deleção do

resíduo de aminoácido correspondente com o resíduo de lisina C-terminal da cadeia pesada de DX2504 (SEQ ID N°: 17). Um exemplo de tal uma cadeia pesada é a de DX2507 (SEQ ID N°: 19) descrita no Exemplo 2 abaixo.

[0097] Os mutantes de deleção descritos acima podem compreender ainda uma cadeia leve, que pode compreender a região V_L de DX2504 ou a região V_L de qualquer um dos mutantes de cisteína aqui descritos.

[0098] Em alguns exemplos, o mutante de deleção compreende uma cadeia leve compreendendo as mesmas CRDS da V_L que DX2504, 532A-X53-C02, ou 532A-X53-B03 (por exemplo, a mesma V_L que DX2504, 532A-X53-C02, ou 532A-X53-B03), uma cadeia pesada compreendendo as mesmas CDRS da V_H que DX2504 (por exemplo, a mesma V_H que DX2504) e uma região constante da cadeia pesada tendo uma deleção na posição correspondente ao resíduo de lisina C-terminal da cadeia pesada de DX2504.

[0099] Qualquer um dos mutantes de cisteína e deleção aqui descritos pode se ligar a FcRn humano com uma constante de dissociação (K_D) inferior a 10 nM.

[00100] Além de ter as sequências de aminoácidos descritas neste documento, os anticorpos anti-FcRn aqui descritos podem ter qualquer *framework* estrutural. Assim, por exemplo, as regiões CDR1, CDR2, e CDR3 descritas acima podem ser incorporadas em um *framework* de anticorpo "tradicional" ou podem ser incorporadas em um *framework* scFv ou Fab. O anticorpo anti-FcRn aqui descrito pode ser um anticorpo de comprimento total ou fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos, por exemplo, anticorpo Fab, F(ab)'2, Fv ou ScFv. Pode ser um anticorpo não humano tal como um anticorpo murino (por exemplo, um anticorpo monoclonal produzido por uma linhagem de células de hibridoma), um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado.

[00101] Também no âmbito da presente divulgação estão ácidos

nucleicos compreendendo sequências de nucleotídeos que codificam a V_H e/ou V_L de qualquer um dos anticorpos anti-FcRn aqui descritos (por exemplo, qualquer um dos mutantes de cisteína ou qualquer um dos mutantes de deleção descritos acima). Tais sequências de ácidos nucleicos podem ser inseridas em vetores de expressão, que podem ser introduzidos em células hospedeiras adequadas (por exemplo, células bacterianas tais como células de *E. coli*, células de levedura, células de inseto, células vegetais ou células de mamíferos) para a produção de anticorpos anti-FcRn via tecnologia recombinante.

Métodos de Produção de Anticorpos Monoclonais de Camundongo

[00102] Métodos de produção de anticorpos monoclonais foram descritos (Harlow et al., *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988)). Em alguns casos, como uma primeira etapa, um roedor, por exemplo, um camundongo, é imunizado com um polipeptídeo antigênico para gerar uma resposta de anticorpos. Porque FcRn é expresso ubiquitariamente e apresenta alto grau de homologia entre as espécies, a imunização por polipeptídeo não foi bem sucedida em produzir anticorpos monoclonais específicos FcRn com alta afinidade ou anticorpos bloqueadores monoclonais de FcRn. Para resolver este problema, a vacinação de DNA pode ser realizada (Castagliola et al., *J. Immunology* 160: 1458 (1998)). A vacinação de DNA envolve imunizar um roedor, por exemplo, um camundongo com um construto de cDNA codificando FcRn ou um fragmento do mesmo. A imunização pode ser administrada por via intramuscular, intraperitoneal, subcutânea, intravenosa, por intradérmica ou diretamente no nó de linfa. Em uma modalidade, as imunizações administradas por via intramuscular. A vacinação de DNA pode ser administrada com um adjuvante, por exemplo, adjuvante de Freund completo ou adjuvante de Freund incompleto. A vacinação de DNA pode ser acompanhada pela administração de uma cardiotoxina para aumentar a concentração de anticorpos. A administração

de uma cardiotoxina provoca morte celular e a regeneração celular, o que aumenta a absorção celular da vacina de DNA administrada. A cardiotoxina também pode aumentar a inflamação que resulta em uma resposta imune mais robusta.

[00103] Células secretoras de anticorpos (células B) são isoladas do roedor. Normalmente, a célula B pode ser isolada do baço de roedores e fundida com uma linhagem de células de mieloma. As linhagem de células de mieloma são linhagem de células imortalizadas que não produzem anticorpos. A linhagem de células de mieloma pode ser escolhida, entre outras, a partir de P3-X63Ag8, X63Ag8.653, Sp2/0-Ag14, FO, NSI/1-Ag4-1, NSO/1, FOX-NY, Y3-Ag 1.2.3, YB2/0 e IR983F.

[00104] Esplenócitos são fundidos com a linhagem de células de mieloma para formar um hibridoma. A fusão pode ser mediada pela mistura dos dois tipos de células com polietilenoglicol durante um período de tempo adequado (por exemplo, cinco minutos). Os hibridomas formados são cultivados na cultura de células usando meios de seleção apropriados (por exemplo, HAT) e selecionados por sua capacidade de produzir um anticorpo monoclonal contra FcRn. A triagem pode ser realizada usando técnicas imunológicas conhecidas, por exemplo, um ELISA.

[00105] Outra abordagem para produzir os anticorpos monoclonais específicos FcRn é imunizar um camundongo knockout para FcRn transgênico com FcRn humano solúvel, veja, Pedido PCT WO 02/43658. WO 02/43658 descreve um camundongo transgênico, cujo genoma é composto por uma perturbação homozigota em seu gene FcRn endógeno, em que a referida perturbação homozigota impede a expressão de uma proteína de FcRn funcional. O anticorpo monoclonal da invenção não é produzido em um camundongo transgênico, cujo genoma é composto por uma perturbação homozigota em seu gene FcRn endógeno, em que a referida perturbação homozigota impede a expressão de uma

proteína de FcRn funcional. O anticorpo monoclonal da invenção não compreende uma célula B de um camundongo transgênico, cujo genoma é composto por uma perturbação homozigota em seu gene FcRn endógeno, em que a referida perturbação homozigota impede a expressão de uma proteína de FcRn funcional.

Bibliotecas de Exibição de Anticorpos Anti-FcRn Humanizados

[00106] Uma biblioteca de exibição pode ser usada para identificar anticorpos que se ligam ao FcRn. Uma biblioteca de exibição é uma coleção de entidades; cada entidade inclui um componente de polipeptídeo acessível e um componente recuperável que codifica ou identifica o componente do polipeptídeo. O componente do polipeptídeo é variado para que as sequências de aminoácidos diferentes sejam representadas. O componente do polipeptídeo pode ter qualquer tamanho, por exemplo, de três aminoácidos a mais de 300 aminoácidos. Em uma seleção, o componente do polipeptídeo de cada membro da biblioteca é sondada com o FcRn e, se o componente de polipeptídeo se liga ao FcRn, o membro de biblioteca de exibição é identificado, geralmente por retenção sobre um suporte. Além disso, uma entidade da biblioteca de exibição pode incluir mais de um componente dos polipeptídeos, por exemplo, as duas cadeias polipeptídicas de um sFab.

[00107] Membros da biblioteca de exibição retidos são recuperados do suporte e analisados. A análise pode incluir amplificação e uma posterior seleção sob condições semelhantes ou diferentes. Por exemplo, seleções positivas e negativas podem ser alternadas. A análise também pode incluir a determinação da sequência de aminoácidos do componente do polipeptídeo e purificação do componente do polipeptídeo para a caracterização detalhada.

[00108] Uma variedade de formatos pode ser usada para bibliotecas de exibição. Exemplos incluem o seguinte.

[00109] **Phage display.** Um formato utiliza vírus, particularmente de

bacteriófagos. Este formato é denominado "*phage display*". O componente da proteína normalmente está ligado covalentemente a uma proteína do revestimento do bacteriófago. Os resultados de ligação de tradução de um ácido nucleico codificando o componente da proteína se fundiram à proteína de revestimento. A ligação pode incluir um ligante de peptídeo flexível, um sítio de protease, ou um aminoácido incorporado como resultado da supressão de um códon de terminação. *Phage display* é descrito, por exemplo, em U.S. 5,223,409; Smith (1985) Science 228: 1315-1317; WO 92/18619; WO 91/17271; WO92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; WO90/02809; de Haard et al. (1999) J. Biol. Chem 274: 18218-30; Hoogenboom et al. (1998) Immunotechnology 4: 1-20; Hoogenboom et al. (2000) Immunol Today 2:371-8; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9: 1370-1372; Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246: 1275-1281; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrard et al. (1991) Bio/Technology 9: 1373-1377; and Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137.

[00110] Sistemas de *phage display* foram desenvolvidos para fago filamentoso (fago fl, fd e M13), bem como outro bacteriófago. Os sistemas de *phage display* de fago filamentoso normalmente usam fusões para uma proteína de revestimento menor, como proteína do gene III e proteína do gene VIII, uma proteína de revestimento principal, mas se funde com outras proteínas do revestimento, como a proteína do gene VI, proteína do gene VII, proteína do gene IX ou domínios das mesmas também podem ser utilizados (ver, por exemplo, WO00/71694). Em uma modalidade, a fusão é um domínio da proteína do gene III, por exemplo, o domínio âncora ou "coto", (ver, por exemplo, Patente US Nº 5.658.727 para obter uma descrição do domínio âncora da proteína do gene III). Também é possível associar

fisicamente a proteína que está sendo exibida ao revestimento usando uma ligação não peptídica.

[00111] Bacteriófago exibindo o componente da proteína pode ser cultivado e colhido usando métodos de preparação do fago padrão, por exemplo, precipitação com PEG dos meios de crescimento. Após a seleção dos fagos de exibição individuais, o ácido nucleico codificando os componentes selecionados da proteína podem ser isolados de células infectadas com os fagos selecionados ou dos próprios fagos, após a amplificação. Colônias individuais ou placas podem ser selecionadas, o ácido nucleico isolado e sequenciado.

[00112] **Outros Formatos de Exibição.** Outros formatos de exibição incluem a exibição baseada em célula (ver, por exemplo, WO 03/029456), fusões de ácido nucleico e proteína (ver, por exemplo, US 6.207.446) e exibição de ribossomo (ver, por exemplo, Mattheakis et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9022 e Hanes et al. (2000) Nat Biotechnol. 18: 1287-92; Hanes et al. (2000) Methods Enzymol. 328:404-30; e Schaffitzel et al. (1999) J Immunol Methods. 231(1-2): 119-35).

[00113] **Arcabouços (Scaffolds).** Arcabouços para exposição podem incluir: anticorpos (por exemplo, fragmentos Fab, moléculas de cadeia única Fv (scFV), anticorpos de domínio único, anticorpos de camelídeos e anticorpos camelizados); receptores de células T; proteínas MHC; domínios extracelulares (por exemplo, repetições Tipo III da fibronectina, repetições de EGF); inibidores de protease (por exemplo, domínios tipo Kunitz, ecotina, BPTI e assim por diante); repetições de TPR; estruturas trifoil; domínios de dedo de zinco; proteínas de ligação a DNA; proteínas de ligação a DNA particularmente monoméricas; proteínas de ligação a RNA; enzimas, por exemplo, proteases (particularmente proteases inativadas), RNase; chaperonas, por exemplo, tioredoxina e proteínas de choque de calor; domínios de sinalização intracelulares (tais como domínios SH2 e SH3);

peptídeos lineares e restritos; e substratos de peptídeo linear. Bibliotecas de exibição podem incluir diversidade natural e/ou sintética. Veja, por exemplo, U.S. 2004-0005709.

[00114] Tecnologia de exibição também pode ser usada para obter anticorpos que ligam epítomos específicos de um alvo. Isto pode ser feito, por exemplo, ao usar as moléculas não alvo concorrentes que não possuem o epítomo específico ou são uma mutação dentro do epítomo, por exemplo, a alanina. Tais moléculas não alvo podem ser usadas em um procedimento de seleção negativa, conforme descrito abaixo, como moléculas concorrentes ao ligar uma biblioteca de exibição ao alvo, ou como um agente de pré-eluição, por exemplo, para capturar em uma solução de lavagem, dissociando membros da biblioteca de exibição que não são específicos ao alvo.

[00115] **Seleção Iterativa.** Em uma modalidade, tecnologia de biblioteca de exibição é usada em um modo iterativo. Uma primeira biblioteca de exibição é usada para identificar um ou mais anticorpos que se ligam a um alvo. Estes anticorpos identificados são, então, variados usando um método de mutagênese para formar uma segunda biblioteca de exibição. Anticorpos de maior afinidade são, então, selecionados a partir da segunda biblioteca, por exemplo, usando maior rigor ou condições de lavagem e ligação mais competitiva.

[00116] Em algumas implementações, a mutagênese é direcionada para regiões sabidamente ou provavelmente na interface de ligação. No caso de anticorpos, a mutagênese pode ser direcionada para as regiões CDR das cadeias leves ou pesadas conforme descrito neste documento. Além disso, a mutagênese pode ser direcionada para regiões de *framework* perto ou adjacentes a CDRs. No caso de anticorpos, a mutagênese também pode ser limitada a uma ou a algumas das CDRs, por exemplo, fazer melhorias precisas passo a passo. Técnicas de mutagênese exemplares incluem: PCR propensa a erros, recombinação, *DNA*

shuffling, mutagênese direcionada ao sítio e mutagênese de cassete.

[00117] Em um exemplo de seleção iterativa, os métodos descritos neste documento são usados para identificar primeiro um anticorpo de uma biblioteca de exibição que liga um FcRn com pelo menos uma especificidade de ligação mínima a um alvo ou uma atividade mínima, por exemplo, uma constante de dissociação de equilíbrio para ligação inferior a 1 nM, 10 nM, ou 100 nM. A sequência do ácido nucleico codificando os anticorpos identificados iniciais são usados como um modelo de ácidos nucleicos para a introdução de variações, por exemplo, para identificar um segundo anticorpo que possui propriedades potencializadas (por exemplo, afinidade de ligação, cinética ou estabilidade) em relação a anticorpos iniciais.

[00118] **Seleção por Dissociação.** Já que uma taxa lenta de dissociação pode ser preditiva de alta afinidade, particularmente no que diz respeito a interações entre os anticorpos e os alvos, os métodos descritos neste documento podem ser usados para isolar os anticorpos com uma taxa de dissociação cinética desejada (por exemplo, reduzida) para uma interação de ligação a um alvo.

[00119] Para selecionar anticorpos de desassociação lenta de uma biblioteca de exibição, a biblioteca é contatada para um alvo imobilizado. O alvo imobilizado é, então, lavado com uma primeira solução que remove biomoléculas ligadas não especificamente ou fracamente. Então, os anticorpos ligados são eluídos com uma segunda solução que inclui uma quantidade saturante de alvo livre ou um anticorpo monoclonal concorrente de alta afinidade específico ao alvo, ou seja, reproduções do alvo que não estão ligadas à partícula. O alvo livre se liga a biomoléculas que se dissociam do alvo. Religação é efetivamente impedida pela quantidade saturante de alvo livre em relação à concentração muito baixa de alvo imobilizado.

[00120] A segunda solução pode ter condições de solução que são substancialmente fisiológicas ou que são rigorosas. Normalmente, as condições de

solução da segunda solução são idênticas às condições de solução da primeira solução. Frações da segunda solução são coletadas na ordem temporal para distinguir frações iniciais das posteriores. Frações posteriores incluem biomoléculas que se dissociam a uma taxa mais lenta do alvo do que biomoléculas nas primeiras frações.

[00121] Além disso, também é possível recuperar membros da biblioteca de exibição que permanecem ligados ao alvo mesmo após incubação prolongada. Estes também podem ser dissociados usando condições caotrópicas ou podem ser amplificados enquanto ligado ao alvo. Por exemplo, fago ligado ao alvo pode ser posto em contato com células bacterianas.

[00122] **Seleção ou Triagem para Especificidade.** Os métodos de triagem da biblioteca de exibição aqui descritos podem incluir um processo de seleção ou triagem que descarta membros da biblioteca de exibição que se ligam a uma molécula não alvo. Exemplos de moléculas não alvo incluem estreptavidina em esferas magnéticas, bloqueando agentes tais como albumina de soro bovino, leite bovino sem gordura, qualquer captura ou alvo imobilizando o anticorpo monoclonal, ou células não transfectadas que não expressam o alvo FcRn humano.

Em uma implementação, a chamada etapa de "seleção negativa" é usada para discriminar entre o alvo e molécula não alvo relacionada e uma molécula não alvo relacionada, mas distintas. A biblioteca de exibição ou um pool da mesma é posta em contato com a molécula não alvo. Membros da amostra que não ligam o não alvo são coletados e utilizados em seleções subsequentes para a ligação com a molécula alvo ou mesmo para seleções negativas subsequentes. A etapa de seleção negativa pode ser antes ou depois da seleção de membros da biblioteca que se ligam à molécula alvo.

[00123] Em outra implementação, é usada uma etapa de triagem. Após membros da biblioteca de exibição serem isolados para ligação com a molécula

alvo, cada membro da biblioteca isolado é testado em sua capacidade de se ligar a uma molécula não alvo (por exemplo, um não alvo listado acima). Por exemplo, uma triagem ELISA de alta produtividade pode ser usada para obter esses dados. A triagem ELISA também pode ser usada para obter dados quantitativos para ligação de cada membro da biblioteca com o alvo, bem como para cruzar a reatividade de espécies com alvos relacionados ou subunidades alvo (por exemplo, FcRn de rato; β 2 microglobulina) e também sob condição diferente, tal como pH 6 ou pH 7,5. São comparados dados de ligação não alvo e alvo (por exemplo, usando um computador e software) para identificar membros da biblioteca que se ligam especificamente ao alvo.

Outras Bibliotecas de Expressão

[00124] Outros tipos de coletas de proteínas (por exemplo, bibliotecas de expressão) podem ser usados para identificar proteínas com uma propriedade específica (por exemplo, a capacidade de ligar FcRn e/ou capacidade de modular FcRn), incluindo, por exemplo, arranjos de proteína de anticorpos (ver, por exemplo, De Wildt et al. (2000) Nat. Biotechnol. 18:989-994), bibliotecas lambda gtl I, bibliotecas duplo-híbrido e assim por diante.

Bibliotecas de Anticorpo

[00125] Em uma modalidade, a biblioteca apresenta um pool de polipeptídeos diversificado, cada um dos quais inclui um domínio imunoglobulina, por exemplo, um domínio variável de imunoglobulina. Bibliotecas de exibição são particularmente úteis, por exemplo, para identificação anticorpos humanos ou "humanizados" que reconhecem antígenos humanos. Tais anticorpos podem ser usados como terapêuticos para tratar distúrbios humanos, tais como doenças autoimunes. Devido às regiões constantes e de *framework* do anticorpo serem humanas, estes anticorpos terapêuticos podem evitar serem reconhecidos e direcionados como antígenos. As regiões de constantes também podem ser

otimizadas para recrutar funções efetoras do sistema imunológico humano. O processo de seleção de exibição *in vitro* supera a incapacidade de um sistema imunológico humano normal de gerar anticorpos contra autoantígenos.

[00126] Uma biblioteca de exibição de anticorpo típica exibe um polipeptídeo que inclui um domínio V_H e um domínio V_L . Um "domínio imunoglobulina" se refere a um domínio do domínio variável ou constante das moléculas de imunoglobulina. Domínios imunoglobulina normalmente contêm duas folhas β , formadas por cerca de sete filamentos β e uma ligação dissulfeto conservada (ver, por exemplo, A. F. Williams and A. N. Barclay 1988 *Ann. Rev. Immunol.* 6:381-405). A biblioteca de exibição pode exibir o anticorpo como um fragmento Fab (por exemplo, usando duas cadeias polipeptídicas) ou uma cadeia única Fv (por exemplo, usando uma única cadeia polipeptídica). Outros formatos também podem ser usados.

[00127] Como no caso de Fab e outros formatos, o anticorpo exibido pode incluir uma ou mais regiões constantes como parte de uma cadeia leve e/ou pesada. Em uma modalidade, cada cadeia inclui uma região constante, por exemplo, como é o caso de um Fab. Em outras modalidades, regiões constantes adicionais são exibidas.

[00128] Bibliotecas de anticorpo podem ser construídas por uma série de processos (ver, por exemplo, de Haard et al., 1999, *J. Biol. Chem.* 274: 18218-30; Hoogenboom et al., 1998, *Immunotechnology* 4: 1-20; and Hoogenboom et al., 2000, *Immunol. Today* 21:371-378. Além disso, elementos de cada processo podem ser combinados com os de outros processos. Os processos podem ser usados de tal forma que a variação é introduzida em um único domínio imunoglobulina (por exemplo, V_H ou V_L) ou em múltiplos domínios imunoglobulina (por exemplo, V_H e V_L). A variação pode ser introduzida em um domínio variável de imunoglobulina, por exemplo, na região de um ou mais de CDR1, CDR2, CDR3, FR1, FR2, FR3 e FR4,

se referindo a tais regiões de qualquer um e ambos os domínios variáveis de cadeia pesada e leve. Em uma modalidade, a variação é introduzida em todas as três CDRs de um determinado domínio variável. Em outra modalidade, a variação é introduzida em CDR1 e CDR2, por exemplo, de um domínio variável da cadeia pesada. Qualquer combinação é possível. Em um processo, bibliotecas de anticorpo são construídas inserindo diversos oligonucleotídeos que codificam CDRs para as regiões correspondentes do ácido nucleico. Os oligonucleotídeos podem ser sintetizados usando nucleotídeos ou trinucleotídeos monoméricos. Por exemplo, Knappik et al., 2000, J. Mol. Biol. 296:57-86 descreve um método para a construção de oligonucleotídeos de codificação de CDR usando síntese de trinucleotídeo e um modelo com sítios de restrição projetados para aceitar os oligonucleotídeos.

[00129] Em outro processo, um animal, por exemplo, um roedor, é imunizado com o FcRn. O animal é reforçado, opcionalmente, com o antígeno para estimular ainda mais a resposta. Então, as células do baço são isoladas do animal, e o ácido nucleico codificando domínios V_H e/ou V_L é amplificado e clonado para expressão na biblioteca de exibição.

[00130] Em ainda outro processo, bibliotecas de anticorpo são construídas a partir de ácido nucleico amplificado de genes de imunoglobulinas de linha genética não expostos. O ácido nucleico amplificado inclui ácido nucleico codificando o domínio V_H e/ou V_L . Fontes de ácidos nucleicos codificadores de imunoglobulina são descritas abaixo. A amplificação pode incluir PCR, por exemplo, com iniciadores que se anelam à região conservada constante, ou outro método de amplificação.

[00131] Ácido nucleico codificando domínios imunoglobulinas pode ser obtido a partir das células do sistema imunológico de, por exemplo, um humano, um primata, camundongo, coelho, camelo, lhama ou roedor. Em um exemplo, as células são selecionadas para uma determinada propriedade. Células B em diversas fases

de maturidade podem ser selecionadas. Em outro exemplo, as células B não são expostas.

[00132] Em uma modalidade, a separação de células ativadas por fluorescência (FACS) é usada para classificar as células B que expressam moléculas de IgG, IgM e IgD ligadas à superfície. Além disso, as células B expressando diferentes isotipos de IgG podem ser isoladas. Em outra modalidade, a célula B ou T é cultivada *in vitro*. As células podem ser estimuladas *in vitro*, por exemplo, cultivando com células alimentadoras ou adicionando mitógenos ou outros reagentes moduladores, tais como anticorpos, a CD40, ligante CD40 ou CD20, acetato miristato de forbol, lipopolissacarídeo bacteriano, concanavalina A, fitohemaglutinina ou mitógeno de *pokeweed* (*Phytolacca americana*).

[00133] Em ainda uma modalidade, as células estão isoladas de um sujeito que tem uma doença autoimune, por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatoide, vasculite, síndrome de Sjögren, esclerose sistêmica ou síndrome antifosfolípido. O sujeito pode ser um humano ou um animal, por exemplo, um modelo animal para a doença humana, ou um animal tendo um distúrbio análogo. Em ainda uma modalidade, as células são isoladas de um animal não humano geneticamente modificado que inclui um locus de imunoglobulina humana.

[00134] Em uma modalidades, as células ativaram um programa de hipermutação somática. As células podem ser estimuladas a se submeterem à mutagênese somática de genes de imunoglobulinas, por exemplo, por tratamento com anticorpos anti-imunoglobulina, anti-CD40 e anti-CD38 (ver, por exemplo, Bergthorsdottir et al., 2001, J. Immunol. 166:2228). Em uma modalidade, as células não são expostas.

[00135] O ácido nucleico codificando um domínio variável de imunoglobulina pode ser isolado de um repertório natural pelo seguinte método exemplar. Primeiro, o RNA é isolado da célula imune. mRNAs de comprimento total

(ou seja, encapados) são separados (por exemplo, degradando RNAs desencapados com fosfatase intestinal de bezerro). O cap é então removido com ácido pirofosfatase de tabaco e a transcrição reversa é usada para produzir os cDNAs.

[00136] A transcrição reversa do primeiro filamento (antisense) pode ser feita de qualquer maneira com qualquer iniciador adequado. Veja, por exemplo, de Haard et al., 1999, J. Biol. Chem. 274: 18218-30. A região de ligação do iniciador pode ser constante entre imunoglobulinas diferentes, por exemplo, a fim de reverter, transcreva diferentes isotipos de imunoglobulinas. A região de ligação do iniciador também pode ser específica para um determinado isotipo de imunoglobulina. Normalmente, o iniciador é específico para uma região que é 3' para uma sequência codificando pelo menos uma CDR. Em uma modalidade, iniciadores poli-dT podem ser usados (e podem ser preferidos para os genes da cadeia pesada).

[00137] Uma sequência sintética pode ser ligada à extremidade 3' do filamento transcrito reverso. A sequência sintética pode ser usada como um sítio de ligação do iniciador para ligar o iniciador *forward* durante a amplificação por PCR após a transcrição reversa. O uso da sequência sintética pode obviar a necessidade de usar um pool de diferentes iniciadores *forward* para capturar totalmente a diversidade disponível.

[00138] O gene codificador de domínio variável é, então, amplificado, por exemplo, usando uma ou mais rodadas. Se forem utilizadas várias rodadas, iniciadores aninhados podem ser usados para maior fidelidade. O ácido nucleico amplificado é, então, clonado em um vetor da biblioteca de exibição.

Métodos de Triagem Secundária

[00139] Depois de selecionar os membros candidatos da biblioteca que se ligam a um alvo, cada membro candidato da biblioteca pode ser analisado adicionalmente, por exemplo, para caracterizar ainda mais suas propriedades de

ligação ao alvo. Cada membro candidato da biblioteca pode ser submetido a um ou mais ensaios de triagem secundária. O ensaio pode ser para uma propriedade de ligação, uma propriedade catalítica, uma propriedade inibitória, uma propriedade fisiológica (por exemplo, citotoxicidade, liberação renal, imunogenicidade), uma propriedade estrutural (por exemplo, estabilidade, conformação, estado de oligomerização) ou outra propriedade funcional. O mesmo ensaio pode ser usado várias vezes, mas com condições variáveis, por exemplo, para determinar as sensibilidades de pH, iônicas, ou térmicas.

[00140] Conforme o caso, os ensaios podem usar um membro da biblioteca de exibição diretamente, um polipeptídeo recombinante produzido a partir do ácido nucleico codificando o polipeptídeo selecionado ou um peptídeo sintético sintetizado com base na sequência do polipeptídeo selecionado. Ensaios exemplares para propriedades de ligação incluem o seguinte.

[00141] **ELISA.** Os anticorpos selecionados a partir de uma biblioteca de expressão também podem ser submetidos à triagem para uma propriedade de ligação usando um ELISA. Por exemplo, cada anticorpo é posto em contato com uma placa de microtitulação cuja superfície inferior foi revestida com o alvo, por exemplo, uma quantidade limitante do alvo. A placa é lavada com tampão para remover polipeptídeos ligados não especificamente. Então, a quantidade do anticorpo ligado à placa é determinada pela sondagem da placa com um anticorpo que pode reconhecer o anticorpo de teste, por exemplo, um marcador ou porção constante do anticorpo. O anticorpo de detecção está ligado a uma enzima como fosfatase alcalina ou peroxidase de raiz forte (HRP) que produz um produto colorimétrico quando os substratos apropriados são fornecidos.

[00142] No caso de um anticorpo de uma biblioteca de exibição, o anticorpo pode ser purificado de células ou analisado em um formato de biblioteca de exibição, por exemplo, como uma fusão de um revestimento de bacteriófagos

filamentosos. Em uma outra versão do ELISA, cada anticorpo selecionado a partir de uma biblioteca de expressão é usado para revestir um poço diferente de uma placa de titulação. O ELISA, então, prossegue usando uma molécula alvo constante para consultar cada poço.

[00143] **Ensaio de Ligação Homogênea.** A interação de ligação do anticorpo candidato com um alvo pode ser analisada usando um ensaio homogêneo, isto é, depois de todos os componentes do ensaio serem adicionados, manipulações adicionais de fluido não são necessárias. Por exemplo, a transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET) pode ser usada como um ensaio homogêneo (ver, por exemplo, Lakowicz et al., Patente US Nº 5.631.169; Stavrianopoulos, et al., Patente US Nº 4,868,103). Um marcador fluoróforo na primeira molécula (por exemplo, a molécula identificada na fração) é selecionado de forma que sua energia fluorescente emitida pode ser absorvida por uma marca fluorescente em uma segunda molécula (por exemplo, o alvo), se a segunda molécula está em proximidade com a primeira molécula. O marcador fluorescente sobre a segunda molécula fluoresce quando este absorve a energia transferida. Já que a eficiência de transferência de energia entre os marcadores está relacionada com a distância que separa as moléculas, a relação espacial entre as moléculas pode ser avaliada. Em uma situação em que a ligação ocorre entre as moléculas, a emissão fluorescente do marcador da molécula 'aceitadora' no ensaio deve ser máxima. Um evento de ligação que está configurado para monitoramento por FRET pode ser convenientemente medido através de meios de detecção fluorométrica padrão conhecidos na técnica (por exemplo, usando um fluorímetro). Ao titular a quantidade da primeira ou segunda molécula de ligação, uma curva de ligação pode ser gerada para estimar a constante de ligação de equilíbrio.

[00144] Outro exemplo de um ensaio homogêneo é ALPHASCREEN™ (Packard Bioscience, Meriden CT). ALPHASCREEN™ usa duas esferas marcadas.

Uma esfera gera oxigênio singlete quando excitada com um laser. A outra esfera gera um sinal luminoso quando oxigênio singlete se difunde da primeira esfera e colide com ela. O sinal é gerado apenas quando as duas esferas estão em proximidade. Uma esfera pode ser anexada ao membro da biblioteca de exibição, a outra, ao alvo. Os sinais são medidos para determinar a extensão da ligação.

[00145] Os ensaios homogêneos podem ser executados enquanto o polipeptídeo candidato é anexado ao veículo da biblioteca de exibição, por exemplo, um bacteriófago.

[00146] **Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR).** A interação de ligação de uma molécula isolada de uma biblioteca de expressão e um alvo pode ser analisada usando SPR. SPR ou Análise de Interação Biomolecular (BIA) detecta interações bioespecíficas em tempo real, sem qualquer teoria de marcação. Alterações na massa na superfície de ligação (indicativo de um evento de ligação) do resultado do chip BIA em alterações do índice de refração da luz perto da superfície (o fenômeno óptico da ressonância de plasmon de superfície (SPR)). As mudanças na refratividade geram um sinal detectável, que são medidas como uma indicação de reações em tempo real entre moléculas biológicas. Métodos para usar a SPR são descritos, por exemplo, em Patente US Nº 5.641.640; Raether, 1988, Surface Plasmons Springer Verlag; Sjolander and Urbaniczky, 1991, Anal. Chem. 63:2338-2345; Szabo et al., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705 e fontes online fornecidas pela BIAcore International AB (Uppsala, Suécia).

[00147] Informações da SPR podem ser usadas para fornecer uma medida exata e quantitativa da constante de dissociação de equilíbrio (K_d) e parâmetros cinéticos, incluindo K_{on} e K_{off} , para a ligação de uma biomolécula para um alvo. Tais dados podem ser usados para comparar biomoléculas diferentes. Por exemplo, as proteínas selecionadas a partir de uma biblioteca de expressão podem ser comparadas para identificar as proteínas que têm alta afinidade para o alvo ou

que têm um lento K_{off} . Esta informação também pode ser usada para desenvolver as relações estrutura-atividade (SAR). Por exemplo, os parâmetros cinéticos e de ligação de equilíbrio das versões amadurecidas de uma proteína de origem podem ser comparados com os parâmetros da proteína de origem. Os aminoácidos variáveis em determinadas posições podem ser identificados que se correlacionam com parâmetros de ligação específica, por exemplo, alta afinidade e K_{off} lento. Esta informação pode ser combinada com modelagem estrutural (por exemplo, usando modelagem por homologia, minimização de energia ou determinação de estrutura por cristalografia de raio-x ou NMR). Como resultado, uma compreensão da interação física entre a proteína e seu alvo física pode ser formulada e usada para orientar outros processos de projeto.

[00148] Ensaios Celulares. Uma biblioteca de anticorpos candidatos (por exemplo, anteriormente identificados por uma biblioteca de exibição ou de outra forma) pode ser rastreada para ligação direcionada nas células que expressam transitoria ou estavelmente e exibem o alvo de interesse na superfície celular. Por exemplo, o alvo pode incluir sequências de ácido nucleico do vetor que incluem segmentos que codificam apenas a porção extracelular dos polipeptídeos, tal que os polipeptídeos quiméricos alvos são produzidos dentro da célula, secretados a partir da célula, ou anexados à superfície celular através da âncora, por exemplo, em fusão com proteínas de ancoragem de membrana, como o Fc. O alvo expresso na superfície celular pode ser usado para triar os anticorpos que se ligam ao FcRn e bloqueiam a ligação de IgG-Fc. Por exemplo, IgG-Fc humana não específica poderia ser marcado de forma fluorescente e sua ligação ao FcRn na presença da ausência do anticorpo antagônico pode ser detectada por uma mudança na intensidade de fluorescência, usando citometria de fluxo, por exemplo, uma máquina de FACS.

Outros Métodos para Obtenção de anticorpos de ligação ao FcRn

[00149] Além do uso de bibliotecas de exibição, outros métodos podem

ser usados para obter um anticorpo de ligação ao FcRn. Por exemplo, a proteína do FcRn ou uma região desta pode ser usada como um antígeno em um animal não humano, por exemplo, um roedor.

[00150] Em uma modalidade, o animal não humano inclui pelo menos uma parte de um gene de imunoglobulina humana. Por exemplo, é possível projetar cepas de camundongo deficientes na produção de anticorpos de camundongo com grandes fragmentos dos loci de Ig humana. Usando a tecnologia de hibridoma, anticorpos monoclonais antígeno-específicos (Mabs) derivados dos genes com a especificidade desejada podem ser produzidos e selecionados. Vide, por exemplo, XENOMOUSE™, Green et al., 1994, Nat. Gen. 7: 13-21; U.S. 2003-0070185, WO 96/34096, publicado em 31 de outubro de 1996, e Pedido PCT N°. PCT/US96/05928, depositado em 29 de abril de 1996.

[00151] Em uma modalidade, um anticorpo monoclonal é obtido a partir do animal não humano, e, em seguida, modificado, por exemplo, humanizado ou desimmunizado. Winter descreve um método de enxerto de CDR que pode ser usado para preparar os anticorpos humanizados (Pedido de Patente UK GB 2188638A, depositado em 26 de março de 1987; Patente US N° 5,225,539. Todas as CDRs de um anticorpo humano específico podem ser substituídas por pelo menos uma porção de uma CDR não humana ou apenas algumas das CDRs podem ser substituídas por CDRs não humanas. É apenas necessário substituir o número de CDRs necessárias para a ligação do anticorpo humanizado a um antígeno predeterminado.

[00152] Anticorpos humanizados podem ser gerados, substituindo as sequências da região variável Fv que não estão diretamente envolvidos na ligação ao antígeno por sequências equivalentes de regiões variáveis Fv humanas. Métodos gerais para a geração de anticorpos humanizados são fornecidos por Morrison, S. L., 1985, Science 229: 1202-1207, por Oi et al, 1986, BioTechniques 4:214 e por

Queen et al. Patente US N^{os}. 5,585,089, US 5,693,761 e US 5,693,762. Estes métodos incluem o isolamento, manipulação e expressão das sequências de ácido nucleicos que codificam toda ou parte das regiões variáveis Fv da imunoglobulina de pelo menos uma cadeia pesada ou leve. As fontes de tais ácidos nucleicos são bem conhecidas para aqueles versados na técnica e, por exemplo, podem ser obtidas a partir de um hibridoma que produz um anticorpo contra um alvo predeterminado, conforme descrito acima. O DNA recombinante que codifica o anticorpo humanizado, ou seu fragmento, pode então ser clonado em um vetor de expressão apropriado.

[00153] Um anticorpos de ligação ao FcRn também pode ser modificado pela deleção específica de epítomos de célula T humana ou "desimunização", pelos métodos divulgados naWO98/52976 eWO00/34317, cujos conteúdos estão especificamente incorporados neste documento para referência. Resumidamente, as regiões variáveis da cadeia pesada e leve de um anticorpo podem ser analisadas para peptídeos que se ligam ao MHC de Classe II; esses peptídeos representam potenciais epítomos de célula T (conforme definido naWO98/52976 eWO00/34317). Para a detecção de potenciais epítomos de célula T, uma abordagem de modelagem por computador denominada "rosqueamento de peptídeo" pode ser aplicada, e, além de um banco de dados de peptídeos de ligação de MHC de classe II humano, pode ser pesquisado para os *motifs* presentes nas sequências de V_H e V_L, conforme descrito naWO98/52976 eWO00/34317. Estes *motifs* se ligam a qualquer um dos 18 alotipos DR principais do MHC de classe II e, desse modo, constituem potenciais epítomos de célula T. Os epítomos potenciais de célula T detectados podem ser eliminados, substituindo pequenos números de resíduos de aminoácidos nas regiões variáveis ou por substituições de um aminoácido único. Na medida do possível, as substituições conservadoras são feitas, frequentemente, mas não exclusivamente, um aminoácido comum nesta posição nas sequências de anticorpo da linha genética

humana podem ser usadas. As sequências da linha germinativa humana são divulgadas em Tomlinson, LA. et al., 1992, J. Mol. Biol. 227:776-798; Cook, G. P. et al., 1995, Immunol. Today Vol. 16 (5):: 237-242; Chothia, D. et al., 1992, J. Mol. Bio. 227:799-817. O diretório BASE V fornece um diretório abrangente de sequências de região variável de imunoglobulina humana (compilado por Tomlinson, L.A. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). Após as mudanças de desimunização serem identificadas, os ácidos nucleicos que codificam V_H e V_L podem ser construídos por mutagênese ou por outros métodos sintéticos (por exemplo, síntese de novo, substituição de cassete e assim por diante). A sequência variável com mutagênese pode, opcionalmente, ser fundida a uma região constante humana, por exemplo, IgG1 humana ou regiões constantes κ.

[00154] Em alguns casos, um epítipo potencial de célula T irá incluir resíduos que são conhecidos ou previstos para serem importante para a função do anticorpo. Por exemplo, os epítipos potenciais de célula T são geralmente tendenciosos em direção às CDRs. Além disso, os epítipos potenciais de célula T podem ocorrer em resíduos de *framework* importantes para a estrutura e ligação do anticorpo. As mudanças para eliminar esses epítipos potenciais irão, em alguns casos, exigir um exame mais minucioso, por exemplo, produzindo e testando cadeias com e sem a mudança. Onde possível, os epítipos potenciais de células T que sobrepõem as CDRs foram eliminados por substituições por fora das CDRs. Em alguns casos, uma alteração dentro da CDR é a única opção, e, portanto, as variantes com e sem esta substituição devem ser testadas. Em outros casos, a substituição necessária para remover um epítipo potencial de célula T está em uma posição de resíduo dentro do *framework* que pode ser crítica para a ligação do anticorpo. Nesses casos, as variantes com e sem esta substituição devem ser testadas. Assim, em alguns casos, diversas regiões variáveis desimunizadas de cadeia pesada e leve foram projetadas e várias combinações de cadeia pesada/leve

testadas a fim de identificar o anticorpo desimunizado ideal. A escolha do anticorpo desimunizado final pode ser, então, feita, considerando a afinidade de ligação das variantes diferentes em conjunto com a extensão da desimunização, isto é, o número de potenciais epítomos de célula T restantes na região variável. A desimunização pode ser usada para modificar qualquer anticorpo, por exemplo, um anticorpo que inclui uma sequência não humana, por exemplo, um anticorpo sintético, um anticorpo murino diferente do anticorpo monoclonal não humano, ou um anticorpo isolado de uma biblioteca de exibição.

Anticorpos de Linha Genética.

[00155] Um anticorpo usado para tratar uma doença autoimune mediada por IgG pode ser usado para múltiplas administrações. As precauções que reduziriam a imunogenicidade do anticorpo terapêutico incluem a reversão de um ou mais aminoácidos de linha não genética nas regiões de *framework* para os aminoácidos de linha genética correspondentes (por exemplo, desde que as propriedades de ligação sejam substancialmente retidas) do anticorpo (especialmente de Fabs).

[00156] É possível modificar um anticorpo que liga o FcRn, por exemplo, um anticorpo descrito neste documento, a fim de tornar as regiões variáveis do anticorpo mais semelhantes a uma ou mais sequências de linha genética. Por exemplo, um anticorpo pode incluir uma, duas, três ou mais substituições de aminoácidos, por exemplo, em um *framework*, CDR ou região constante, para torná-lo mais semelhante a uma sequência de linha genética de referência. Um método criação de linha genética exemplar pode incluir a identificação de uma ou mais sequências de linha genética que são semelhantes (por exemplo, mais semelhantes em um banco de dados específico) à sequência do anticorpo isolado. As mutações (no nível de aminoácido) podem, então, ser feitas no anticorpo isolado, incrementalmente ou em combinação com outras mutações. Por exemplo, uma

biblioteca de ácido nucleico que inclui as sequências que codificam algumas ou todas as mutações de linha genética possíveis é feita. Os anticorpos mutantes são então avaliados, por exemplo, para identificar um anticorpo que tem um ou mais resíduos de linha genética adicional em relação ao anticorpo isolado e que é útil ainda (por exemplo, tem uma atividade funcional). Em uma modalidade, os resíduos de linha genética são introduzidos um anticorpo isolado tanto quanto possível.

[00157] Em uma modalidade, a mutagênese é usada para substituir ou inserir um ou mais resíduos de linha genética em uma região de *framework* e/ou região constante. Por exemplo, um resíduo de região de *framework* e/ou de região constante pode ser de uma sequência de linha genética que é semelhante (por exemplo, mais semelhante) à região não variável sendo modificada. Após a mutagênese, a atividade (por exemplo, ligação ou outra atividade funcional) do anticorpo pode ser avaliada para determinar se o resíduo ou resíduos de linha genética são tolerados (isto é, não anular a atividade). Uma mutagênese semelhante pode ser realizada nas regiões de *framework*.

[00158] A seleção de uma sequência de linha genética pode ser realizada de diferentes maneiras. Por exemplo, uma sequência de linha genética pode ser selecionada se ela atender a um critério predeterminado para a seletividade ou semelhança, por exemplo, pelo menos uma certa identidade percentual, por exemplo, pelo menos 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 99,5% de identidade. A seleção pode ser executada, usando pelo menos 2, 3, 5 ou 10 sequências de linha genética. No caso de CDR1 e CDR2, a identificação de uma sequência de linha genética semelhante pode incluir a seleção de tal sequência. No caso de CDR3, a identificação de uma sequência de linha genética semelhante pode incluir a seleção de tal sequência, mas pode incluir o uso duas sequências de linha genética que, separadamente, contribuem para a porção amino-terminal e para a porção carbóxi-terminal. Em outras implementações, mais que uma

ou duas sequências de linha genética são usadas, por exemplo, para formar uma sequência consenso.

[00159] Em uma modalidade, em relação a uma sequência de domínio variável de referência específica, por exemplo, uma sequência descrita neste documento, uma sequência de domínio variável relacionada tem pelo menos 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 ou 100% das posições de aminoácidos de CDR que não são idênticas aos resíduos nas sequências de CDR de referência, resíduos que são idênticos aos resíduos nas posições correspondentes em uma sequência de linha genética humana (isto é, uma sequência de aminoácidos codificada pelo ácido nucleico de linha genética humana).

[00160] Em uma modalidade, em relação a uma sequência de domínio variável de referência específica, por exemplo, uma sequência descrita neste documento, uma sequência de domínio variável relacionada tem pelo menos 30, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100% das regiões FR idênticos à sequência de FR de uma sequência de linha genética humana, por exemplo, uma sequência de linha genética relacionada com a sequência de domínio variável de referência.

[00161] Nesse sentido, é possível isolar um anticorpo que tem atividade semelhante a um determinado anticorpo de interesse, mas é mais semelhante a uma ou mais sequências de linha genética, especificamente uma ou mais sequências de linha genética humana. Por exemplo, um anticorpo pode ser pelo menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 99,5% idêntico a uma sequência de linha genética em uma região de fora das CDRs (por exemplo, regiões de *framework*). Além disso, um anticorpo pode incluir pelo menos 1, 2, 3, 4 ou 5 resíduos de linha genética em uma região de CDR, o resíduo de linha genética sendo de uma sequência de linha genética do semelhante (por exemplo, mais semelhante) à região variável sendo modificada. As sequências de linha genética de interesse primário são sequências de linha genética humana. A atividade do

anticorpo (por exemplo, a atividade de ligação) pode estar dentro de um fator ou 100, 10, 5, 2, 0,5, 0,1 e 0,001 do anticorpo original.

[00162] As sequências de linha genética de referência exemplares para V_{kappa} incluem: 012/02, 018/08, A20, A30, L14, L1, L15, L4/18a, L5/L19, L8, L23, L9, L24, L11, L12, O11/O1, A17, A1, A18, A2, A19/A3, A23, A27, A11, L2/L16, L6, L20, L25, B3, B2, A26/A10 e A14. Vide, por exemplo, Tomlinson et al, 1995, EMBO J. 14 (18):4628-3.

[00163] Uma sequência de referência de linha genética para o domínio variável de HC pode ser baseada em uma sequência que tem estruturas canônicas específicas, por exemplo, estruturas 1-3 nas voltas hipervariáveis de H1 e H2. As estruturas canônicas das voltas hipervariáveis de um domínio variável de imunoglobulina podem ser inferidas a partir de sua sequência, conforme descrito em Chothia et al., 1992, J. Mol. Biol. 227:799-817; Tomlinson et al., 1992, J. Mol. Biol. 227:776-798); and Tomlinson et al., 1995, EMBO J. 14 (18):4628-38. As sequências exemplares com uma estrutura 1-3 incluem: DP-1, DP-8, DP-12, DP-2, DP-25, DP-15, DP-7, DP-4, DP-31, DP-32, DP-33, DP-35, DP-40, 7-2, hv3005, hv3005f3, DP-46, DP-47, DP-58, DP-49, DP-50, DP-51, DP-53 e DP-54.

Produção de Ligante

[00164] Métodos padrões de ácido nucleico recombinante podem ser usados para expressar um anticorpo que se liga ao FcRn. Geralmente, uma sequência de ácido nucleico que codifica o anticorpo é clonada em um vetor de expressão de ácido nucleico. É claro, se o anticorpo incluir várias cadeias polipeptídicas, cada cadeia pode ser clonada em um vetor de expressão, por exemplo, os mesmos vetores ou vetores diferentes, que são expressos nas mesmas células ou células diferentes.

[00165] **Produção de Anticorpo.** Alguns anticorpos, por exemplo, os Fabs podem ser produzidos em células bacterianas, por exemplo, células de *E. coli*.

Por exemplo, se o Fab for codificado por sequências em um vetor de exibição do fago que inclui um códon de parada suprimível entre a entidade de exibição e uma proteína do bacteriófago (ou seus fragmentos), o ácido nucleico do vetor pode ser transferido para uma célula bacteriana que não pode suprimir um códon de parada. Neste caso, o Fab não é fundido à proteína do gene III e é secretado no periplasma e/ou no meio.

[00166] Os anticorpos também podem ser produzidos em células eucarióticas. Em uma modalidade, os anticorpos (por exemplo, do scFv) são expressos em uma célula de levedura, tal como *Pichia* (vide, por exemplo, Powers et al., 2001, J. Immunol. Methods. 251: 123-35), *Hanseula*, ou *Saccharomyces*.

[00167] Em uma modalidade, os anticorpos são produzidos em células de mamíferos. As células do hospedeiro mamífero para expressar os anticorpos clones ou seus fragmentos de ligação ao antígeno incluem Ovário de Hamster Chinês (células CHO) (incluindo células dhfr-CHO, descritas em Urlaub e Chasin, 1980, proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, usado com um marcador de seleção DHFR, por exemplo, conforme descrito em Kaufman e Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601 621), linhagem de células linfocíticas, por exemplo, células de mieloma NS0 e células SP2, células COS e uma célula de um animal transgênico, por exemplo, um mamífero transgênico. Por exemplo, a célula é uma célula epitelial mamária.

[00168] Além da sequência de ácido nucleico que codifica o domínio de imunoglobulina diversificado, os vetores de expressão recombinantes podem carrear sequências adicionais, tais como as sequências que regulam a replicação do vetor nas células hospedeiras (por exemplo, as origens da replicação) e em genes marcadores selecionáveis. O gene marcador selecionável facilita a seleção das células hospedeiras nas quais o vetor foi sendo introduzido (vide, por exemplo, Patente U.S. N^{os}. 4,399,216, 4,634,665 e 5,179,017). Por exemplo, normalmente o gene marcador selecionável confere resistência a drogas, tais como G418,

higromicina ou metotrexato, em uma célula hospedeira, na qual o vetor foi introduzido. Os genes marcadores selecionáveis incluem o gene da dihidrofolato redutase (DHFR) (para uso em células hospedeiras de *dhfr* com seleção/amplificação do metotrexato) e o gene neo (para a seleção de G418).

[00169] Em um sistema exemplar para a expressão recombinante de um anticorpo, ou sua porção ligadora de antígeno, um vetor de expressão recombinante que codifica tanto a cadeia pesada do anticorpo quanto a cadeia leve do anticorpo é introduzido em células CHO de *dhfr* por transfecção mediada por fosfato de cálcio. Dentro do vetor de expressão recombinante, os genes da cadeia pesada e da cadeia leve do anticorpo estão, cada um, operativamente ligados a elementos reguladores potencializadores/promotores (por exemplo, derivados de SV40, CMV, adenovírus e similares, tais como um potencializador de CMV/elemento regulatório promotor de AdMLP ou um potencializador de SV40/elemento regulador promotor de AdMLP) para conduzir altos níveis de transcrição dos genes. O vetor de expressão recombinante também carrega um gene de DHFR, que permite a seleção de células CHO que foram transfectadas com o vetor, usando a seleção/amplificação do metotrexato. As células hospedeiras transformantes selecionadas são cultivadas para permitir a expressão das cadeias pesada e leve do anticorpo e o anticorpo intacto é recuperado do meio de cultura. As técnicas padrões de biologia molecular são usadas para preparar o vetor de expressão recombinante, transfectar as células hospedeiras, selecionar transformantes, cultura de células hospedeiras e recuperar o anticorpo do meio de cultura. Por exemplo, alguns anticorpos podem ser isolados por cromatografia de afinidade com uma matriz acoplada à Proteína A ou Proteína G.

[00170] Para os anticorpos que incluem um domínio Fc, o sistema de produção de anticorpo pode produzir anticorpos nos quais a região Fc é glicosilada. Por exemplo, o domínio Fc das moléculas de IgG é glicosilado em asparagina 297

no domínio CH2. Esta asparagina é o sítio para a modificação com oligossacarídeos do tipo biantenário. Foi demonstrado que esta glicosilação é necessária para as funções efectoras mediadas por receptores Fcg e Clq do complemento (Burton and Woof, 1992, Adv. Immunol. 51: 1-84; Jefferis et al., 1998, Immunol. Rev. 163:59-76). Em uma modalidade, o domínio Fc é produzido em um sistema de expressão de mamíferos que glicosila apropriadamente o resíduo correspondente à asparagina 297. O domínio Fc também pode incluir outras modificações eucarióticas pós-traducionais.

[00171] Os anticorpos também podem ser produzidos por um animal transgênico. Por exemplo, a Patente U.S. Nº. 5,849,992 descreve um método de expressão de um anticorpo na glândula mamária de um mamífero transgênico. Um transgene é construído, incluindo um promotor específico para leite e ácidos nucleicos que codificam o anticorpo de interesse e uma sequência sinal para a secreção. O leite produzido pelas fêmeas desses mamíferos transgênicos inclui, secretado nele, o anticorpo de interesse. O anticorpo pode ser purificado a partir do leite, ou para algumas aplicações, usado diretamente.

[00172] Um método para produzir um camundongo transgênico é o seguinte. Brevemente, um constructo de direcionamento que codifica o anticorpo é microinjetado no pró-núcleo masculino de oócitos fertilizados. Os oócitos são injetados dentro do útero de uma mãe adotiva pseudográvida para o desenvolvimento em filhotes viáveis. Alguns descendentes incorporam o transgene.

Sistemas de Ensaio para Anticorpos Candidatos de FcRn

[00173] Os anticorpos candidatos de FcRn podem ser caracterizados ainda em ensaios que medem sua atividade moduladora em direção ao FcRn ou a fragmentos deste *in vitro* ou *in vivo*. Por exemplo, o FcRn pode ser combinado com um substrato, como IgG não específica ou porção de FC da IgG ou albumina, sob condições de ensaio que permitem a reação do FcRn com o substrato. O ensaio é

realizado na ausência do anticorpo candidato de FcRn e na presença de concentrações crescentes do anticorpo candidato de FcRn. A concentração do anticorpo candidato, no qual 50% da atividade do FcRn (por exemplo, ligação ao substrato) é inibida pelo anticorpo candidato é o valor de IC₅₀ (Concentração Inibitória 50%) ou o valor de EC₅₀ (Concentração Efetiva 50%) para aquele anticorpo. Dentro de uma série ou grupo de anticorpos candidatos, aqueles que têm valores de IC₅₀ ou EC₅₀ mais baixos são considerados inibidores mais potentes de FcRn do que aqueles anticorpos tendo valores de IC₅₀ ou EC₅₀ mais altos. Em algumas modalidades, os anticorpos têm um valor de IC₅₀ de 800 nM, 400 nM, 100 nM, 25 nM, 5 nM, 1 nM, ou menos, conforme medido em um ensaio *in vitro* para a inibição da atividade do FcRn.

[00174] Os anticorpos candidatos também podem ser avaliados para a seletividade em direção ao FcRn. Por exemplo, um anticorpo candidato de FcRn pode ser analisado para sua potência em direção ao FcRn e para um painel de receptores de superfície celular, tais como os receptores que também utilizam o domínio β 2M, e um valor de IC₅₀ ou um valor de EC₅₀ pode ser determinado para cada proteína do receptor. Em uma modalidade, um composto que demonstra um baixo valor de IC₅₀ ou valor de EC₅₀ para o FcRn, e um valor mais alto de IC₅₀ ou valor de EC₅₀ para outros receptores dentro do painel de teste (por exemplo, moléculas de MHC de classe I) é considerado ser seletivo em direção ao FcRn.

[00175] As células endoteliais *ex vivo* ou células epiteliais, expressando o FcRn endógeno, poderiam ser usadas para seguir a endocitose ou transcitose dos anticorpos candidatos sob diferentes condições de pH e temperatura. A transcitose de IgG ou reciclagem por FcRn pode ser medida, seguindo um anticorpo marcado na presença ou ausência de várias substâncias químicas e sob diferentes condições que são conhecidas por influenciar ou afetar a via de tráfego intracelular.

[00176] Um estudo de farmacocinética em ratos, camundongos ou

macacos poderia ser executado com anticorpos de ligação ao FcRn dependentes ou independentes de pH para determinar seu meia-vida no soro. Da mesma forma, o efeito protetor do anticorpo pode ser avaliado *in vivo* para o uso potencial em terapia de imunomodulação ou como uma imunoterapia de salvamento, injetando o anticorpo na presença ou ausência de uma IgG marcada ou a porção Fc marcada da IgG. Uma diminuição da meia-vida do IgG/Fc marcado na presença do anticorpo candidato é uma indicação da eficácia terapêutica do anticorpo.

Composições Farmacêuticas

[00177] Em outro aspecto, a divulgação fornece composições, por exemplo, composições farmacêuticamente aceitáveis ou composições farmacêuticas, que incluem um anticorpo de ligação ao FcRn. O anticorpo de ligação ao FcRn pode ser formulado juntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável. As composições farmacêuticas incluem composições terapêuticas e composições de diagnóstico, por exemplo, composições que incluem anticorpos de ligação ao FcRn marcados para a criação de imagens *in vivo*.

[00178] Um veículo farmacêuticamente aceitável inclui quaisquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardantes de absorção e similares que são fisiologicamente compatíveis. De preferência, um carreador é adequado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinhal ou epidérmica (por exemplo, por injeção ou infusão). Dependendo da via de administração, o anticorpo de ligação ao FcRn pode ser revestido em um material para proteger o composto da ação de ácidos e outras condições naturais que podem inativar o composto.

[00179] Um sal farmacêuticamente aceitável é um sal que retém a atividade biológica desejada do composto de origem e não gera nenhum efeito toxicológico indesejado (vide, por exemplo, Berge, S.M., et al., 1977, J. Pharm. Sci.

66: 1-19). Exemplos de tais sais incluem a sais de adição ácidos e sais de adição básicos. Os sais de adição ácidos incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos não tóxicos, como o clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromídrico, iodídrico, fosforoso e similares, bem como de ácidos orgânicos não tóxicos, tais como os ácidos mono- e dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos substituídos por fenil, ácidos hidróxi alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfônicos alifáticos e aromáticos e similares. Os sais de adição básicos incluem aqueles derivados de metais alcalinos terrosos, tais como sódio, potássio, magnésio, cálcio e similares, bem como os de aminas orgânicas não tóxicas, tais como N, N'-dibenziletlenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e similares.

[00180] As composições podem estar em uma variedade de formas. Essas incluem, por exemplo, formas de dosagem líquidas, semissólidas e sólidas, como soluções líquidas (por exemplo, soluções injetáveis e infusíveis), dispersões ou suspensões, comprimidos, pílulas, pós, lipossomas e supositórios.

[00181] A forma pode depender do modo pretendido da administração e da aplicação terapêutica. Muitas composições estão na forma de soluções injetáveis ou infusíveis, como composições semelhantes àquelas usadas para a administração em humanos com anticorpos. Um modo exemplar de administração é parenteral (por exemplo, intravenosa, subcutânea, intraperitoneal, intramuscular). Em uma modalidade, o anticorpo de ligação ao FcRn é administrado por infusão ou injeção intravenosa. Em outra modalidade, o anticorpo de ligação ao FcRn é administrado por injeção intramuscular ou subcutânea.

[00182] A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, dispersão, lipossoma ou outra estrutura encomendada adequada para uma concentração alta de droga. As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas, incorporando o composto ativo (isto é, o ligante) na quantidade

necessária em um solvente apropriado com um ou uma combinação dos ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido pela esterilização do filtrado. Geralmente, as dispersões são preparadas, incorporando o composto ativo em um excipiente estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários daqueles acima enumerados. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparação são secagem a vácuo e de liofilização que produz um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução deste previamente filtrada esterilizada. A fluidez apropriada de uma solução pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso da dispersão e pelo uso de surfactantes. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser provocada pela inclusão, na composição, de um agente que retarda a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

[00183] Um anticorpo de ligação ao FcRn pode ser administrado por uma variedade de métodos conhecidos na técnica, embora para muitas aplicações, a via/modo de administração é injeção ou infusão intravenosa. Por exemplo, para aplicações terapêuticas, o anticorpo de ligação ao FcRn pode ser administrado por infusão intravenosa a uma taxa de menos de 30, 20, 10, 5 ou 1 mg/min para atingir uma dose de cerca de 1 a 100 mg/m² ou 7 a 25 mg/m². A via e/ou o modo de administração irá variar, dependendo dos resultados desejados. Em certas modalidades, o composto ativo pode ser preparado com um carreador que irá proteger o composto contra a liberação rápida, como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes e sistemas de distribuição microencapsulados. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser usados, tais como etileno vinil acetato, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são patenteados ou

geralmente conhecidos. Vide, por exemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., 1978, Marcel Dekker, Inc., New York.

[00184] Em certas modalidades, o anticorpo pode ser administrado oralmente, por exemplo, com um diluente inerte ou um carreador comestível assimilável. O composto (e outros ingredientes, se desejado) também pode ser colocado em uma cápsula de gelatina de casca dura ou macia, comprimido em comprimidos, ou incorporados diretamente à dieta do sujeito. Para a administração terapêutica oral, os compostos podem ser incorporados com excipientes e usados sob a forma de comprimidos ingeríveis, comprimidos bucais, pastilhas, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, bolachas e similares. Para administrar um composto divulgado neste documento por outra, que não administração parenteral, pode ser necessário revestir o composto com, ou coadministrar o composto com um material para evitar sua inativação.

[00185] As composições farmacêuticas podem ser administradas com dispositivos médicos conhecidos na técnica. Por exemplo, em uma modalidade, uma composição farmacêutica divulgada neste documento pode ser administrada com um dispositivo, por exemplo, um dispositivo de injeção hipodérmica sem agulha, uma bomba, ou implante.

[00186] Em determinadas modalidades, um anticorpo de ligação ao FcRn pode ser formulado para assegurar uma distribuição apropriada *in vivo*. Por exemplo, a barreira hemato-encefálica (BBB) exclui muitos compostos altamente hidrofílicos. Para assegurar que os compostos terapêuticos divulgados neste documento cruzem a BBB (se desejado), eles podem ser formulados, por exemplo, em lipossomas. Para os métodos de fabricação de lipossomas, vide, por exemplo, Patentes U.S. N^{os}. 4,522,811; 5,374,548; e 5,399,331. Os lipossomas podem compreender uma ou mais frações que são seletivamente transportadas em células ou órgãos específicos, potencializando, assim, a distribuição de drogas direcionadas

(vide, por exemplo, V.V. Ranade, 1989, J. Clin. Pharmacol. 29:685).

[00187] Os regimes de dosagem são ajustados para fornecer a resposta desejada ideal (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um bolus único pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada, conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parenterais em forma de unidade de dosagem para facilitar a administração e a uniformidade da dosagem. A forma de unidade de dosagem neste documento refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como doses unitárias para os sujeitos a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada do composto ativo calculado para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o carreador farmacêutica necessário. A especificação para as formas de unidade de dosagem pode ser ditada por e diretamente dependente de (a) as características únicas do composto ativo e o efeito terapêutico específico a ser alcançado, e (b) as limitações inerentes à técnica da criação de composições, como um composto ativo para o tratamento da sensibilidade nos indivíduos.

[00188] Uma faixa exemplar, não limitante para uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de um anticorpo divulgado neste documento é 0,1-20 mg/kg ou 1-10 mg/kg. Um anticorpo anti-FcRn pode ser administrado, por exemplo, por infusão intravenosa, por exemplo, a uma taxa de menos de 30, 20, 10, 5 ou 1 mg/min para atingir a uma dose de cerca de 1 a 100 mg/m² ou cerca de 5 a 30 mg/m². Os valores de dosagem podem variar com o tipo e a gravidade da condição a ser aliviada. Para um sujeito específico, os regimes de dosagem específicos podem ser ajustados ao longo do tempo, de acordo com a necessidade individual e o julgamento profissional da pessoa administrando ou supervisionando a administração das composições.

[00189] As composições farmacêuticas divulgadas neste documento podem incluir uma quantidade terapeuticamente eficaz ou uma quantidade profilaticamente eficaz de um anticorpo de ligação ao FcRn aqui divulgado. Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em doses e por períodos de tempo necessários, para atingir o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição pode variar de acordo com fatores, tais como o estado de doença, idade, sexo e peso do indivíduo e a capacidade do anticorpo em provocar uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz também é uma na qual quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais da composição são compensados pelos efeitos benéficos terapeuticamente.

Estabilização e Retenção

[00190] Em uma modalidade, um anticorpo de ligação ao FcRn está fisicamente associado a um fração que melhora sua estabilização e/ou retenção na circulação, por exemplo, no sangue, soro, linfa ou outros tecidos, por exemplo, em pelo menos 1,5, 2, 5, 10 ou 50 vezes. Por exemplo, um anticorpo de ligação ao FcRn pode estar associado com um polímero, por exemplo, polímeros substancialmente não antigênicos, tais como óxidos de polialquileno ou óxidos de polietileno. Os polímeros adequados irão variar substancialmente em peso. Os polímeros tendo números de pesos moleculares médios, variando de cerca de 200 a cerca de 35.000 (ou cerca de 1.000 a cerca de 15.000 e 2.000 a cerca de 12.500) podem ser usados. Por exemplo, um anticorpo de ligação ao FcRn pode ser conjugado a um polímero solúvel em água, por exemplo, polímeros de polivinil hidrofílicos, por exemplo, álcool polivinílico e polivinilpirrolidona. Uma lista não limitante de tais polímeros incluem homopolímeros de óxido de polialquileno, tais como o polietileno glicol (PEG) ou polipropileno glicóis, polióis polioxietilenados, seus copolímeros e seus copolímeros em bloco, desde que a solubilidade em água

dos copolímeros em bloco seja mantida.

Kits

[00191] Um anticorpo de ligação ao FcRn descrito neste documento pode ser fornecido em um kit, por exemplo, como um componente de um kit. Por exemplo, o kit inclui (a) um anticorpo de ligação ao FcRn, por exemplo, uma composição que inclui um anticorpo de ligação ao FcRn, e, opcionalmente, (b) material informativo. O material informativo pode ser descritivo, instrucional, de propaganda ou outro material que se relacione com os métodos descritos neste documento e/ou com o uso de um anticorpo de ligação ao FcRn para os métodos aqui descritos.

[00192] O material informativo dos kits não está limitado em sua forma. Em uma modalidade, o material informativo pode incluir informações sobre a produção do composto, peso molecular do composto, concentração, data de validade, informações do lote ou do site de produção e assim por diante. Em uma modalidade, o material informativo refere-se a usar o anticorpo para tratar, prevenir, ou diagnosticar um distúrbio descrito neste documento, por exemplo, um distúrbio autoimune.

[00193] Em uma modalidade, o material informativo pode incluir instruções para administrar um anticorpo de ligação ao FcRn de forma adequada para executar os métodos descritos neste documento, por exemplo, em uma dose, forma de dosagem, ou modo de administração adequado (por exemplo, uma dose, forma de dosagem ou modo de administração aqui descrito). Em uma modalidade, o material informativo pode incluir instruções para administrar um anticorpo de ligação ao FcRn a um sujeito adequado, por exemplo, um humano, por exemplo, um humano tendo, ou em risco de, um distúrbio autoimune (por exemplo, artrite reumatoide ou lúpus eritematoso sistêmico). Por exemplo, o material pode incluir instruções para administrar um anticorpo de ligação ao FcRn a um paciente com

lúpus ou a um paciente com outro distúrbio autoimune.

[00194] O material informativo dos kits não está limitado em sua forma. Em muitos casos, o material informativo, por exemplo, as instruções, é fornecido em material impresso, por exemplo, um texto impresso, figura e/ou fotografia, por exemplo, um rótulo ou uma folha impressa. No entanto, o material informativo também pode ser fornecido em outros formatos, tais como material legível em computador, gravação de vídeo ou gravação de áudio. Em uma modalidade, o material informativo do kit são informações de contato, por exemplo, um endereço físico, endereço de e-mail, website ou número de telefone, onde um usuário do kit pode obter informações substantivas sobre um anticorpo de ligação ao FcRn e/ou seu uso nos métodos descritos neste documento. É claro, o material informativo também pode ser fornecido em qualquer combinação de formatos.

[00195] Além de um anticorpo de ligação ao FcRn, a composição do kit pode incluir outros ingredientes, tais como um solvente ou tampão, um estabilizador, um conservante, um agente aromatizante (por exemplo, um antagonista amargo ou adoçante), uma fragrância ou outro ingrediente cosmético e/ou um segundo agente para o tratamento de um distúrbio autoimune, descrito neste documento, por exemplo, artrite reumatoide ou lúpus eritematoso sistêmico. Alternativamente, os outros ingredientes podem ser incluídos no kit, mas em composições ou recipientes diferentes daqueles de um anticorpo de ligação ao FcRn. Em tais modalidades, o kit pode incluir instruções para misturar um anticorpo de ligação ao FcRn e os outros ingredientes, ou para usar um anticorpo de ligação ao FcRn juntamente com os outros ingredientes.

[00196] Um anticorpo de ligação ao FcRn pode ser fornecido em qualquer forma, por exemplo, na forma líquida, seca ou liofilizada. É preferível que um anticorpo de ligação ao FcRn seja substancialmente puro e/ou estéril. Quando um anticorpo de ligação ao FcRn é fornecido em uma solução líquida, a solução

líquida, preferencialmente, é uma solução aquosa, com uma solução aquosa estéril sendo preferida. Quando um anticorpo de ligação ao FcRn é fornecido como uma forma seca, a reconstituição é geralmente pela adição de um solvente adequado. O solvente, por exemplo, água esterilizada ou tampão, pode opcionalmente ser fornecido no kit.

[00197] O kit pode incluir um ou mais recipientes para a composição que contém um anticorpo de ligação ao FcRn. Em algumas modalidades, o kit contém recipientes separados, divisores ou compartimentos para a composição e o material informativo. Por exemplo, a composição pode ser contida em uma garrafa, frasco ou seringa, e o material informativo pode estar contido em uma luva plástica ou pacote. Em outras modalidades, os elementos separados do kit estão contidos dentro de um recipiente único, não dividido. Por exemplo, a composição está contida em uma garrafa, frasco ou seringa, que tenha anexado a si, o material informativo na forma de um rótulo. Em algumas modalidades, o kit inclui uma pluralidade (por exemplo, um pacote) de recipientes individuais, cada um contendo uma ou mais formas de dosagem de unidade (por exemplo, uma forma de dosagem descrita neste documento) de um anticorpo de ligação ao FcRn. Por exemplo, o kit inclui uma pluralidade de seringas, ampolas, embalagens em folha de alumínio ou embalagens alveolares, cada uma contendo uma dose de unidade única de um anticorpo de ligação ao FcRn. Os recipientes dos kits podem ser herméticos, impermeável à água (por exemplo, impermeável a mudanças na umidade ou evaporação) e/ou à prova de luz.

[00198] O kit opcionalmente inclui um dispositivo adequado para a administração da composição, por exemplo, uma seringa, inalante, pipeta, fórceps, colher de medida, conta-gotas (por exemplo, conta-gotas ocular), *swab* (por exemplo, um *swab* de algodão ou *swab* de madeira) ou qualquer dispositivo de distribuição. Em uma modalidade, o dispositivo é um dispositivo implantável que

dispensa doses mensuradas do anticorpo. A divulgação também apresenta um método de fornecimento de um kit, por exemplo, combinando os componentes descritos neste documento.

Tratamentos

[00199] Os anticorpos que se ligam ao FcRn e são identificados pelo método descrito neste documento e/ou detalhado neste documento têm utilidades terapêuticas e profiláticas. Esses anticorpos podem ser administrados a um sujeito para tratar, prevenir e/ou diagnosticar uma variedade de distúrbios, incluindo distúrbios autoimunes, ou até a células em cultura, por exemplo, *in vitro* ou *ex vivo*.

[00200] O termo "tratamento" refere-se à administração de uma terapia em uma quantidade, maneira e/ou modo eficaz para melhorar uma condição, sintoma ou parâmetro associado a um distúrbio ou para impedir a progressão de um distúrbio, tanto em um grau estatisticamente significativo quanto em um grau detectável para uma pessoa versada na técnica. Uma quantidade eficaz, maneira ou modo pode variar, dependendo do sujeito e pode ser adaptado ao sujeito. O sujeito pode ser um humano ou um animal não humano, por exemplo, um mamífero não humano.

[00201] O anticorpo de ligação ao FcRn pode ser administrado em uma quantidade terapeuticamente eficaz, por exemplo, tal que, após a administração de dose única ou múltipla a um sujeito, o sujeito apresente uma melhora dos sintomas de um distúrbio, por exemplo, um distúrbio autoimune (por exemplo, a artrite reumatoide ou lúpus eritematoso sistêmico) ou de um parâmetro indicativo da presença ou risco do distúrbio.

[00202] Os distúrbios exemplares que afetam vários órgãos ou órgãos localizados no corpo incluem: Esclerose Múltipla, artrite reumatoide, doenças inflamatória intestinais (IBD), lúpus e espondilite anquilosante. Alguns desses distúrbios são discutidos abaixo. Em um aspecto, a invenção fornece métodos para

o tratamento de câncer. Outras doenças ainda que podem ser tratadas, usando um anticorpo de ligação ao FcRn incluem: esclerodermia, síndrome de Sjogren, Síndrome de Goodpasture, granulomatose de Wegener, polimialgia reumática, arterite temporal/arterite de células gigantes, alopecia areata, espondilite anquilosante, síndrome antifosfolípide, doença autoimune de Addison, anemia hemolítica autoimune, hepatite autoimune, doença autoimune do ouvido interno, síndrome linfoproliferativa autoimune (ALPS), púrpura trombocitopênica autoimune (ATP), doença de Behçet, penfigoide bolhoso, cardiomiopatia, dermatite-sprue celíaco, síndrome da fadiga crônica, síndrome da deficiência imunológica (CFIDS), polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica, penfigoide cicatricial, doença da aglutinina fria, síndrome CREST, doença de Crohn, doença de Deigo, dermatomiosite, dermatomiosite juvenil, lúpus discoide, crioglobulinemia mista essencial, fibromialgia, fibromiosite, doença de Grave, síndrome de Guillain-Barre, tireoidite de Hashimoto, fibrose pulmonar idiopática, púrpura trombocitopênica idiopática (ITP), nefropatia por IgA, diabetes insulino-dependente (Tipo I), artrite juvenil, a doença de Meniere, doença mista do tecido conjuntivo, miastenia gravis, pênfigo vulgar, pênfigo foliáceo, pênfigo paraneoplásico, anemia perniciosa, poliarterite nodosa, policondrite, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiosite, dermatomiosite, agamaglobulinemia primária, cirrose biliar primária, psoríase, fenômeno de Raynaud, síndrome de Reiter, febre reumática, sarcoidose, síndrome do homem rígido, arterite de Takayasu, colite ulcerativa, uveíte, vasculite, vitiligo.

[00203] Em algumas modalidades, o anticorpo de ligação anti-FcRn é administrado para remover um anticorpo terapêutico indesejado da corrente sanguínea.

[00204] Em algumas modalidades, o anticorpo de ligação anti-FcRn é administrado para suprimir o nível de anticorpos anti-HLA. Em algumas

modalidades, o nível de anticorpos anti-HLA é suprimido em conexão com o transplante de órgãos.

[00205] Os métodos de administração dos anticorpos de ligação ao FcRn são descritos em "Composições Farmacêuticas". As dosagens adequadas das moléculas usadas irão depender da idade e do peso do sujeito e da droga específica usada. Os anticorpos podem ser usados como agentes competitivos para inibir ou reduzir uma interação indesejável, por exemplo, entre um agente natural ou patológico e o FcRn.

[00206] O anticorpo de ligação ao FcRn pode ser usado para distribuir macro e micromoléculas, por exemplo, um gene na célula para fins de terapia gênica, no endotélio ou epitélio e se direcionar apenas àqueles tecidos expressando o FcRn. Os anticorpos podem ser usados para distribuir uma variedade de drogas citotóxicas, incluindo drogas terapêuticas, um composto que emite radiação, moléculas de origem vegetal, fúngica ou bacteriana, proteínas biológicas e suas misturas. As drogas citotóxicas podem ser drogas citotóxicas de atuação intracelular, tais como emissores de radiação de curto alcance, incluindo, por exemplo, emissores-cc de curto alcance e alta energia, conforme descrito neste documento.

[00207] No caso de toxinas polipeptídicas, as técnicas de ácido nucleico recombinante podem ser usadas para construir um ácido nucleico que codifique o anticorpo e a citotoxina (ou um componente polipeptídico desta) como fusões tradicionais. O ácido nucleico recombinante é, então, expresso, por exemplo, em células e o polipeptídeo de fusão codificado, isolado.

[00208] Alternativamente, o anticorpo de ligação ao FcRn pode ser acoplado a emissores de radiação de alta energia, por exemplo, um radioisótopo, como ^{131}I , um γ -emissor, que, quando localizado em um sítio, resulta na morte de diversos diâmetros celulares. Vide, por exemplo, S.E. Order, "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer

Therapy", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin et al. (eds.), pp 303-316 (Academic Press 1985). Outros radioisótopos adequados incluem emissores, como ^{212}Bi , ^{213}Bi e ^{211}At , e emissores β , como ^{186}Re e ^{90}Y . Além disso, ^{177}Lu que também pode ser usado tanto como um agente de imagem quanto citotóxico.

[00209] A radioimunoterapia (RIT) que usa anticorpos marcados com ^{131}I , ^{90}Y e ^{177}Lu está sob intensa investigação clínica. Existem diferenças significativas nas características físicas desses três núclídeos, e como resultado, a escolha do radionuclídeo é muito crítica a fim de distribuir a dose máxima de radiação a um tecido de interesse. As partículas beta de maior energia de ^{90}Y podem ser boas para tumores volumosos. As partículas beta de energia relativamente baixa de ^{131}I são ideais, mas a dehalogenação *in vivo* das moléculas radioiodinadas é uma grande desvantagem para a internalização do anticorpo. Em contraste, ^{177}Lu tem partículas beta de baixa energia com apenas 0,2-0,3 mm de alcance e distribui uma dose de radiação muito mais baixa para a medula óssea, em comparação com ^{90}Y . Além disso, devido à meia-vida física mais longa (em comparação com ^{90}Y), os tempos de residência são mais altos. Como resultado, as atividades mais altas (mais quantidades de mCi) de agentes marcados com ^{177}Lu podem ser administradas com uma dose de radiação comparativamente menor para a medula. Há vários estudos clínicos investigando o uso de anticorpos marcados com ^{177}Lu no tratamento de vários cânceres. (Mulligan T et al., 1995, *Clin. Cancer Res.* 1: 1447-1454; Meredith RF, et al., 1996, *J. Nucl. Med.* 37: 1491-1496; Alvarez RD, et al., 1997, *Gynecol. Oncol.* 65: 94-101).

[00210] O uso dos métodos terapêuticos para tratar a autoimunidade tem uma série de benefícios. Uma vez que os anticorpos reconhecem especificamente o FcRn, outro tecido é poupado e níveis elevados do agente são distribuídos diretamente ao sítio onde a terapia é necessária. O tratamento pode ser

efetivamente controlado com parâmetros clínicos. Alternativamente, esses parâmetros podem ser usados para indicar quando tal tratamento deve ser empregado.

[00211] Um anticorpo de ligação ao FcRn pode ser administrado em combinação com uma ou mais das modalidades existentes para o tratamento de distúrbios autoimunes incluindo, mas não se limitando a: terapia com Ig intravenosa, drogas anti-inflamatórias não esteroidais (NSAID) e os corticosteroides; e tratamentos anti-inflamatórios, como ciclosporinas, rapamicinas ou ascomicinas ou seus análogos imunossuppressores, por exemplo, ciclosporina A, ciclosporina G, FK-506, 40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina etc.; ciclofosfamida; azatiopreno; metotrexato; brequinar; FTY 720; leflunomida; mizoribina; ácido micofenólico; micofenolato de mofetil; 15-deoxiespergualina; anticorpos monoclonais imunossuppressores, por exemplo, anticorpos monoclonais para receptores de leucócitos, por exemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD25, CD28, B7, CD45, ou CD58 ou seus ligantes; ou outros compostos imunomoduladores, por exemplo, CTLA4Ig ou outros inibidores de molécula de adesão, por exemplo, mAbs ou inibidores de baixo peso molecular, incluindo antagonistas de selectina e antagonistas de VLA-4. Essas terapias de combinação podem ser parte de regimes imunomoduladores ou de um regime para o tratamento ou prevenção de rejeição de alio- ou xenoenxerto aguda ou crônica, um distúrbio inflamatório ou distúrbios autoimunes.

Esclerose Múltipla

[00212] A esclerose múltipla (MS) é uma doença do sistema nervoso central que é caracterizada por inflamação e perda das bainhas de mielina.

[00213] Pacientes tendo MS podem ser identificados por critérios que estabelecem um diagnóstico de MS clinicamente definida, conforme definido pelo seminário sobre o diagnóstico da MS (Poser et al., Ann. Neurol. 13:227, 1983). A MS também pode ser diagnosticada por provas de dois ataques e bandas oligoclonais

de IgG no líquido cefalorraquidiano ou por combinação de um ataque, evidência clínica de duas lesões e banda oligoclonal de IgG no líquido cefalorraquidiano. Os critérios de McDonald também podem ser usados para diagnosticar a MS. McDonald et al.(2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis, Ann Neurol 50: 121-127. Os critérios de McDonald incluem o uso de provas de MRI de comprometimento do CNS ao longo do tempo para ser usado no diagnóstico da MS, na ausência de múltiplos ataques clínicos.

[00214] O tratamento eficaz da esclerose múltipla pode ser avaliado de várias maneiras diferentes. Os seguintes parâmetros podem ser usados para avaliar a eficácia do tratamento. Dois critérios exemplares incluem: EDSS (escala expandida do estado de incapacidade) e o aparecimento de exacerbações na MRI (imagem por ressonância magnética). A EDSS é um meio de classificar o comprometimento clínico devido à MS (Kurtzke, Neurology 33: 1444, 1983). Oito sistemas funcionais são avaliados para o tipo e a gravidade do comprometimento neurológico. Brevemente, antes do tratamento, os pacientes são avaliados quanto ao comprometimento nos seguintes sistemas: piramidal, cerebelo, tronco cerebral, sensorial, intestino e bexiga, visual, cerebral e outros. Acompanhamentos são conduzidos em intervalos definidos. A escala varia de 0 (normal) a 10 (morte devido à MS). Uma diminuição de uma etapa completa pode indicar um tratamento eficaz (Kurtzke, Ann. Neurol. 36:573-79, 1994).

[00215] Sintomas exemplares associados à esclerose múltipla, que pode ser tratada com os métodos descritos neste documento, incluem: neurite óptica, diplopia, nistagmo, dismetria ocular, oftalmoplegia internuclear, fosfenos do movimento e som, defeito pupilar aferente, parestesia, monoparesia, paraparesia, hemiparesia, quadraparesia, plegia, paraplegia, hemiplegia, tetraplegia, quadraplegia, espasticidade, disartria, atrofia muscular, espasmos, câibras,

hipotonia, clonia, mioclonia, mioquimia, síndrome das pernas inquietas, pé caído, reflexos disfuncionais, parestesia, anestesia, neuralgia, dor neuropática e neurogênica, L'hermitte, disfunção proprioceptiva, neuralgia do trigêmeo, ataxia, tremor de intenção, dismetria, ataxia vestibular, vertigem, ataxia da fala, distonia, disdiadococinesia, micção frequente, espasticidade da bexiga, bexiga flácida, dissinergia do detrusor-esfíncter, disfunção erétil, anorgasmia, frigidez, constipação, urgência fecal, incontinência fecal, depressão, disfunção cognitiva, demência, alterações de humor, labilidade emocional, euforia, síndrome bipolar, ansiedade, afasia, disfasia, fadiga, sintoma de Uhthoff, refluxo gastroesofágico e distúrbios do sono.

[00216] Além de, ou antes dos, estudos em humanos, um modelo animal pode ser usado para avaliar a eficácia do uso de dois agentes. Um modelo animal exemplar para a esclerose múltipla é o modelo de camundongo de encefalite autoimune experimental (EAE), por exemplo, conforme descrito em (Tuohy et al. (J. Immunol. (1988) 141: 1126-1130), Sobel et al. (J. Immunol. (1984) 132: 2393-2401), and Traugott (Cell Immunol. (1989) 119: 114-129). Aos camundongos podem ser administrados um primeiro e um segundo agente descritos neste documento antes da indução da EAE. Em seguida, os camundongos são avaliados por critérios característicos para determinar a eficácia do uso de dois agentes no modelo.

Doença Inflamatória Intestinal

[00217] As doenças inflamatórias intestinais (IBD) incluem inflamação intestinal recidivante, geralmente crônica. IBD se refere a dois distúrbios distintos, doença de Crohn e colite ulcerativa (UC). Os sintomas clínicos de IBD incluem sangramento retal intermitente, cólica abdominal, perda de peso e diarreia. Um índice clínico também pode ser usado para monitorar a IBD, tal como o Índice de Atividade Clínica para a Colite Ulcerativa. Vide também, Walmsley et al. Gut. 1998 Jul;43(1):29-32 and Jowett et al. (2003) Scand J Gastroenterol. 38(2): 164-71. Um

anticorpo de ligação ao FcRn pode ser usado para amenizar pelo menos um sintoma da IBD ou para amenizar um índice clínico da IBD.

Artrite Reumatoide

[00218] A artrite reumatoide é uma doença inflamatória autoimune que provoca dor, inchaço, rigidez e perda da função nas articulações. A artrite reumatoide apresenta-se frequentemente em um padrão simétrico. A doença pode afetar as articulações do pulso e as articulações dos dedos mais próximas à mão. Ela também pode afetar outras partes do corpo além das articulações. Além disso, pessoas com artrite reumatoide podem ter fadiga, febres ocasionais e um mal-estar geral. Os fatores positivos para o diagnóstico da artrite reumatoide incluem o anticorpo sanguíneo do "fator reumatoide" e o anticorpo de citrulina. Um anticorpo de ligação ao FcRn pode ser útil no tratamento, prevenção, ou alívio da artrite reumatoide ou um ou mais sintomas da artrite reumatoide.

Lúpus

[00219] O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é um distúrbio autoimune que leva à inflamação e a danos em vários tecidos do corpo. O LES pode ser mediado por autoanticorpos dirigidos contra seu próprio DNA. O lúpus pode afetar muitas partes do corpo, incluindo as articulações, pele, rins, coração, pulmões, vasos sanguíneos e cérebro. Embora vários sintomas possam estar presentes, alguns dos mais comuns incluem fadiga extrema, articulações dolorosas ou inchadas (artrite), febre inexplicada, erupções cutâneas e problemas renais. Os sintomas exemplares do lúpus incluem articulações dolorosas ou inchadas, febre inexplicável e fadiga extrema. Uma erupção cutânea vermelha característica pode aparecer em todo o nariz e bochechas. As erupções cutâneas podem ocorrer também no rosto e orelhas, antebraços, ombros, peito e mãos. Outros sintomas do lúpus incluem dor no peito, perda de cabelo, anemia, úlceras na boca e dedos e dedos do pé pálidos ou púrpuras pelo frio e estresse. Algumas pessoas também

sofrem de dor de cabeça, tonturas, depressão, confusão ou convulsões. Os fatores positivos para o diagnóstico de LES incluem anticorpos antinucleares circulantes, anticorpos anti-DNA e anticorpos anti-Sm. Um anticorpo de ligação ao FcRn pode ser útil em tratar, prevenir ou aliviar o LES ou um ou mais sintomas do LES. O lúpus, como usado neste documento, inclui o lúpus cutâneo e nefrite lúpica.

Trombocitopenia Imune (ITP)

[00220] A ITP é uma doença de destruição plaquetária periférica aumentada, onde os pacientes desenvolvem anticorpos que se ligam às proteínas de membrana das plaquetas específicas. Os anticorpos anti-plaquetas opsonizam as plaquetas, levando à destruição pelos macrófagos. As tentativas de tratar a ITP geralmente envolvem a supressão do sistema imunológico, o que causa um aumento nos níveis das plaquetas. Um anticorpo de ligação ao FcRn pode ser útil em tratar, prevenir ou aliviar a ITP, ou um ou mais sintomas desta.

Espondilite Anquilosante

[00221] A espondilite anquilosante é um distúrbio autoimune que não apenas afeta a coluna vertebral, mas também pode afetar os quadris, ombros e joelhos, assim como os tendões e ligamentos em torno dos ossos e as articulações ficam inflamadas, resultando em dor e rigidez. A espondilite anquilosante tende a afetar as pessoas na adolescência tardia ou no início da idade adulta. Um anticorpo de ligação ao FcRn pode ser útil em tratar, prevenir ou aliviar a espondilite anquilosante, ou um ou mais sintomas desta.

Pênfigo

[00222] O pênfigo é um distúrbio autoimune que afeta as membranas mucosas e a pele. O distúrbio é caracterizado pela geração de autoanticorpos contra a desmogleína.

[00223] A desmogleína é uma proteína da família das caderinas e está envolvida com a formação dos desmossomas, que juntam as células umas às

outras. O pênfigo pode ser classificado como um dos três tipos: pênfigo vulgar, a forma mais comum do distúrbio, em que os autoanticorpos se direcionam para a desmogleína 3. No pênfigo foliáceo, autoanticorpos contra a desmogleína 1 são gerados. O terceiro tipo e distúrbio menos comum é o pênfigo paraneoplásico, em que os autoanticorpos se direcionam para as desmoplaquinas e que está associado com cânceres, como o linfoma. Os distúrbios são comumente diagnosticados por um dermatologista pela aparência da pele e são confirmados pela detecção de autoanticorpos contra a desmogleína. Os métodos de tratamento incluem a administração de esteroides e/ou a administração de um anticorpo CD20, como o Rituximabe (Rituxan).

Câncer

[00224] "Câncer", como usado neste documento, refere-se a um crescimento descontrolado das células que interfere com o funcionamento normal dos órgãos e sistemas corporais. Os cânceres que migram de seu local original e se espalham para os órgãos vitais podem eventualmente levar à morte do sujeito através da deterioração funcional dos órgãos afetados. Os carcinomas são cânceres malignos que surgem de células epiteliais e incluem o adenocarcinoma e carcinoma de célula escamosa. Os sarcomas são o câncer do tecido conjuntivo ou de apoio e incluem o osteossarcoma, condrossarcoma e tumor estromal gastrointestinal. Os cânceres hematopoiéticos, como a leucemia, são capazes de superar os compartimentos hematopoiéticos normais em um sujeito, levando, desse modo, à falência hematopoiética (sob a forma de anemia, trombocitopenia e neutropenia), finalmente, causando a morte. Uma pessoa versada na técnica pode classificar um câncer como um sarcoma, carcinoma ou câncer hematopoiético.

[00225] O câncer, como usado neste documento, inclui os seguintes tipos de câncer, câncer de mama, câncer do trato biliar; câncer de bexiga; câncer de cérebro, incluindo glioblastomas e meduloblastomas; cancro do colo do útero;

coriocarcinoma; câncer de cólon; câncer endometrial; câncer de esôfago; câncer gástrico; neoplasias hematológicas, incluindo leucemia mieloide e linfocítica aguda; leucemia/linfoma linfoblástico agudo de célula T; leucemia de células pilosas; leucemia mieloide crônica, mieloma múltiplo; leucemias associadas a AIDS e linfoma ou leucemia de células T adultas; neoplasias intraepiteliais, incluindo doença de Bowen e doença de Paget; câncer de fígado; câncer de pulmão; linfomas, incluindo doença de Hodgkin e linfomas linfocíticos; neuroblastomas; câncer oral, incluindo carcinoma de célula escamosa; câncer ovariano, incluindo aqueles que surgem de células epiteliais, células do estroma, células germinativas e células mesenquimais; câncer pancreático; câncer de próstata; câncer retal; sarcomas, incluindo o leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, lipossarcoma, fibrossarcoma e osteossarcoma; câncer de pele, incluindo melanoma, sarcoma de Kaposi, câncer basocelular e câncer de célula escamosa; câncer de testículo, incluindo tumores germinativos, como seminoma, não seminoma (teratomas, coriocarcinomas), tumores estromais e tumores de células germinativas; câncer de tireoide, incluindo adenocarcinoma da tireoide e carcinoma medular; e câncer renal, incluindo adenocarcinoma e tumor de Wilms. Outros cânceres serão conhecidos para uma pessoa versada na técnica.

Tratamento de Fetos

[00226] O FcRn medeia o transporte de IgG materna através das barreiras de células epiteliais para o feto. Os anticorpos descritos neste documento podem ser usados para distribuir drogas macromoleculares, por exemplo, antibióticos, e/ou pequenas moléculas para os fetos no útero. O feto pode estar sofrendo de uma condição ou distúrbio (por exemplo, uma infecção entérica ou distúrbio metabólico) que necessita de tratamento.

[00227] A droga ou molécula para o tratamento da condição ou distúrbio pode ser conjugada com um anticorpo de ligação ao FcRn e administrada a uma

mulher grávida que tenha um feto no útero que precisa de tratamento. O anticorpo de ligação ao FcRn conjugado se liga ao FcRn e, desse modo, é transportado para o feto através da placenta. O feto recebe o tratamento com a droga ou molécula.

Imunoadsorção

[00228] Em algumas modalidades, a invenção fornece métodos para a remoção de um anticorpo terapêutico indesejado de um indivíduo. Em algumas modalidades, o anticorpo terapêutico indesejado é um anticorpo IgG. Em algumas modalidades, o anticorpo terapêutico indesejado é um anticorpo anti-VLA4, como o Natalizumabe (Tysabri, Biogen Idee/Elan), efalizumabe (Raptiva, Genentech), bevacizumabe (Avastin, Genentech) e as proteínas de fusão de Fc, como o etanercepte (Enbrel, Amgen/Wyeth). A terapia com o anticorpo monoclonal Natalizumabe tem sido associada à Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (PML). A depleção do anticorpo terapêutico da corrente sanguínea e/ou do resto do corpo pode alterar a progressão da PML.

[00229] Em algumas modalidades, os métodos de tratamento apresentados neste documento podem ser combinados com os métodos para remover ou remover parcialmente os anticorpos terapêuticos da corrente sanguínea de um sujeito. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-FcRn apresentados neste documento podem ser combinados com uma proteína de captura que pode ligar um anticorpo terapêutico, as combinações resultando em uma depuração aumentada do anticorpo terapêutico da corrente sanguínea. Em algumas modalidades, o método de remoção ou remoção parcial do anticorpo terapêutico da corrente sanguínea de um sujeito é a troca de plasma (PLEX). Em algumas modalidades, os anticorpos anti-FcRn podem ser administrados a um sujeito submetido à troca de plasma. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-FcRn podem ser usados como um imunoadsorvente para o FcRn no processo de troca de plasma.

[00230] Na troca de plasma (também chamada de aférese ou plasmáférese), o sangue é retirado do corpo e o plasma contendo um agente indesejado, tal como colesterol ou um anticorpo terapêutico, é removido do sangue por um separador de célula. O sangue pode ser removido do corpo em porções ou ele pode ser removido em um modo de fluxo contínuo, com o último permitindo a reintrodução do sangue processado no corpo. O plasma removido compreendendo o agente indesejado pode ser descartado e o paciente pode receber o plasma do doador ou salina com proteínas adicionadas em troca. Em algumas modalidades, várias rodadas de troca de plasma podem ser necessárias para remover o agente indesejado do sangue ou para diminuir o nível do agente indesejado no sangue a um nível aceitável. Em algumas modalidades, o sangue é "filtrado" e o agente indesejado, removido, antes de retornar o sangue ao paciente. Os métodos de troca de plasma são conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, em US 6.960.178.

[00231] A troca de plasma mostrou reduzir os níveis de anticorpo terapêutico no sangue de um sujeito e a restauração da homeostase (vide, por exemplo, Khatri et al, 2009; Neurology 72:402-409).

[00232] Um anticorpo terapêutico baseado em IgG (como o natalizumabe) pode ser removido do sangue, plasma ou soro, fazendo o sangue entrar em contato com a proteína de captura, proteína A estafilocócica, que irá ligar a região Fc da IgG e remover o anticorpo IgG da corrente sanguínea. Outras proteínas de captura podem ser usadas para anticorpos de isotipos diferentes. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-FcRn podem ser usados como uma proteína de captura no processo de troca de plasma, resultando na remoção de FcRn da corrente sanguínea, aumentando, assim, a quantidade de anticorpo terapêutico "livre". O anticorpo terapêutico "livre" resultante terá uma meia-vida mais curta do que o anticorpo presente antes do tratamento e/ou pode ser removido do

sangue mais facilmente com uma proteína de captura diferente (como a proteína A). Em algumas modalidades, os anticorpos anti-FcRn são administrados ao paciente durante ou antes da troca de plasma. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-FcRn podem ser imobilizados e usados em uma coluna, resultando na ligação do FcRn. Em algumas modalidades, o sangue de um paciente que contém um anticorpo terapêutico é posto em contato com anticorpo anti-FcRn imobilizado e com a proteína A imobilizada.

[00233] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-FcRn apresentados neste documento podem ser usados na terapia de "resgate" para os anticorpos terapêuticos que foram administrados e mostraram um efeito adverso. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-FcRn pode ser usado como uma alternativa para a troca de plasma. A administração de um anti-FcRn pode efetuar a depleção do anticorpo terapêutico sem os riscos associados à plasmaférese e à troca de plasma, como o acesso vascular, a terapia de citrato e o suprimento de plasma do doador.

Antígenos de leucócitos humanos

[00234] Os antígenos de leucócitos humanos (HLA) apresentam peptídeos e antígenos do lado de fora da célula, que são posteriormente reconhecidos por células T, que, por sua vez, podem ativar as células B. O painel dos genes de HLA disponível é exclusivo para cada pessoa. Qualquer célula exibindo um HLA que é "não próprio" resultará na indução de uma resposta imune. Em geral, quanto mais diferente o HLA "não próprio" do HLA próprio, mais forte é a resposta imune. Por exemplo, no caso de transplantes de órgão, os sujeitos com genes HLA semelhantes são preferidos para minimizar a resposta imune. Os anticorpos HLA específicos do doador foram descobertos estarem associados à falha do enxerto no transplante de rim, coração, pulmão e fígado.

[00235] Em algumas modalidades, a invenção fornece métodos para a

diminuição do nível de anticorpos HLA "não próprios" em um indivíduo. A diminuição do nível de anticorpos HLA "não próprios" pode resultar na supressão de uma resposta imune, por exemplo, durante o transplante de órgão. Em algumas modalidades, a uma pessoa que será submetida a um transplante de órgão é administrado um anticorpo anti-FcRn. Em algumas modalidades, a uma pessoa que está sendo submetida a um transplante de órgão é administrado um anticorpo anti-FcRn. Em algumas modalidades, a uma pessoa que recebeu um transplante de órgão é administrado um anticorpo anti-FcRn. Os ensaios para a medição dos níveis de anticorpos HLA são bem conhecidos na técnica.

Usos Diagnósticos

[00236] Os anticorpos que se ligam ao FcRn e são identificados pelo método descrito neste documento e/ou detalhados neste documento têm utilidades diagnósticas *in vitro* e *in vivo*.

[00237] Em um aspecto, a divulgação fornece um método de diagnóstico para detectar a presença de um FcRn, *in vitro* ou *in vivo* (por exemplo, imagens *in vivo* em um sujeito). O método pode incluir localizar o FcRn em uma localização subcelular, por exemplo, no endossomo. O método pode incluir: (i) o contato de uma amostra com anticorpo de ligação ao FcRn; e (ii) a detecção da formação de um complexo entre o anticorpo de ligação ao FcRn e a amostra. O método também pode incluir o contato de uma amostra de referência (por exemplo, uma amostra controle) com o anticorpo, e a determinação da extensão da formação do complexo entre o anticorpo e a amostra, em relação à mesma para a amostra de referência. Uma mudança, por exemplo, uma mudança estatisticamente significativa, na formação do complexo na amostra ou sujeito em relação à amostra controle ou sujeito pode ser indicativa da presença de FcRn na amostra.

[00238] Outro método exemplar inclui: (i) a administração do anticorpo de ligação ao FcRn a um sujeito; e (iii) a detecção da formação de um complexo

entre o anticorpo de ligação ao FcRn e o sujeito. A detecção pode incluir a determinação do local ou tempo de formação do complexo.

[00239] O anticorpo de ligação ao FcRn pode ser direta ou indiretamente marcado com uma substância detectável para facilitar a detecção do anticorpo ligado ou não ligado. As substâncias detectáveis adequadas incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes e materiais radioativos.

[00240] A formação do complexo entre o anticorpo de ligação ao FcRn e o FcRn pode ser detectada através da medição ou visualização tanto do anticorpo ligado ao FcRn quanto do anticorpo não ligado. Os ensaios de detecção convencional podem ser usados, por exemplo, ensaios de imunoadsorção enzimática (ELISA), um radioensaio (RIA) ou imunohistoquímica de tecido. Além da marcação do anticorpo de ligação ao FcRn, a presença do FcRn pode ser analisada em uma amostra por um ensaio de competição, utilizando padrões marcados com uma substância detectável e um anticorpo de ligação ao FcRn não marcado. Em um exemplo deste ensaio, a amostra biológica, os padrões marcados e o anticorpo de ligação ao FcRn são combinados e a quantidade de padrão marcado ligado ao anticorpo não marcado é determinada. A quantidade de FcRn na amostra é inversamente proporcional à quantidade do padrão marcado ligado ao anticorpo de ligação ao FcRn.

[00241] Anticorpos marcados com fluoróforo e cromóforo podem ser preparados. Devido ao fato de que os anticorpos e outras proteínas absorvem luz com comprimentos de onda de até cerca de 310 nm, as frações fluorescentes devem ser selecionadas para terem absorção substancial em comprimentos de onda acima de 310 nm e, preferencialmente, acima de 400 nm. Uma variedade de fluorescentes e cromóforos adequados são descritos por Stryer, 1968, Science 162:526 e Brand, L. et al., 1972, Annu. Rev. Biochem. 41:843 868. Os anticorpos

podem ser marcados com grupos cromóforos fluorescentes por procedimentos convencionais, tais como aqueles divulgados na Patente U.S. Nºs. 3,940,475, 4,289,747 e 4,376,110. Um grupo de fluorescentes tendo um número de propriedades desejáveis descritas acima são os corantes de xanteno, que incluem o fluoresceínas e rodaminas. Outro grupo de compostos fluorescentes são as naftilaminas. Uma vez marcado com um fluoróforo ou cromóforo, o anticorpo pode ser usado para detectar a presença ou a localização do FcRn em uma amostra, por exemplo, usando microscopia fluorescente (como microscopia confocal ou deconvolução).

[00242] **Análise Histológica.** A imunohistoquímica pode ser realizada, usando os anticorpos descritos neste documento. Por exemplo, o anticorpo pode ser sintetizado com um marcador (como uma marcação de purificação ou epítopo), ou pode ser detectavelmente marcado, por exemplo, conjugando um marcador ou grupo de ligação a um marcador. Por exemplo, um quelante pode ser anexado ao anticorpo. O anticorpo é, então, posto em contato com uma preparação histológica, por exemplo, uma seção fixa do tecido que está numa lâmina de microscópio. Após uma incubação para a ligação, a preparação é lavada para remover o anticorpo não ligado. A preparação é, então, analisada, por exemplo, usando microscopia, para identificar se o anticorpo está ligado à preparação.

[00243] Claro, o anticorpo pode não estar marcado no momento da ligação. Após a ligação e a lavagem, o anticorpo é marcado a fim de torná-lo detectável.

[00244] **Arranjos de Proteína.** O anticorpo de ligação ao FcRn também pode ser imobilizado em um arranjo de proteína. O arranjo de proteína pode ser usado como uma ferramenta diagnóstica, por exemplo, para triar amostras médicas (como células isoladas, sangue, soros, biópsias e similares). Claro, o arranjo de proteína também pode incluir outros ligantes, por exemplo, que se ligam ao FcRn ou

a outras moléculas alvos.

[00245] Os métodos de produção dos arranjos polipeptídicos são descritos, por exemplo, em De Wildt et al, 2000, Nat. Biotechnol. 18:989-994; Lueking et al., 1999, Anal. Biochem. 270: 103-111; Ge, 2000, Nucleic Acids Res. 28, e3, 1- VII; MacBeath and Schreiber, 2000, Science 289: 1760-1763; WO01/40803 eWO99/51773A1. Os polipeptídeos para o arranjo podem ser manchados em alta velocidade, por exemplo, usando aparelhos robóticos comercialmente disponíveis, por exemplo, da Genetic Microsystems ou BioRobotics. O substrato do arranjo pode ser, por exemplo, nitrocelulose, plástico, vidro, por exemplo, vidro de superfície modificada. O arranjo também pode incluir uma matriz porosa, por exemplo, acrilamida, agarose ou outro polímero.

[00246] Por exemplo, o arranjo pode ser um arranjo de anticorpos, por exemplo, conforme descrito em De Wildt, *supra*. As células que produzem os anticorpos podem ser cultivadas em um filtro em um formato agrupado. A produção de anticorpo é induzida, e os polipeptídeos expressos são imobilizados para o filtro na localização da célula. Um arranjo de anticorpo pode ser posto em contato com um alvo marcado para determinar a extensão da ligação do alvo para cada anticorpo imobilizado. As informações sobre a extensão da ligação em cada endereço do arranjo podem ser armazenadas como um perfil, por exemplo, em um banco de dados de computador. O arranjo de anticorpo pode ser produzido em replicatas e usado para comparar os perfis de ligação, por exemplo, de um alvo e um não alvo.

[00247] **FACS (Separação de Células Ativadas por Fluorescência).** O anticorpo de ligação ao FcRn pode ser usado para marcar células, por exemplo, em uma amostra (por exemplo, uma amostra de paciente). O anticorpo é também anexado (ou anexável) a um composto fluorescente. As células podem então ser separadas usando o separador de células ativadas por fluorescência (por exemplo, usando um separador disponível pela Becton Dickinson Immunocytometry Systems,

San Jose, CA; vide também Patentes U.S. N^{os}. 5,627,037; 5,030,002; e 5,137,809). Conforme as células atravessam o separador, um feixe de laser excita o composto fluorescente enquanto um detector conta as células que atravessam e determina se um composto fluorescente está anexado à célula através da detecção da fluorescência. A quantidade de marcadores ligados a cada célula pode ser quantificada e analisada para caracterizar a amostra.

[00248] O separador também pode desviar a célula e separar as células ligadas pelo anticorpo daquelas células não ligadas pelo anticorpo. As células separadas podem ser cultivadas e/ou caracterizadas.

[00249] Imagens *In vivo*. Também é apresentado um método para detectar a presença de tecidos expressando o FcRn *in vivo*. O método inclui (i) a administração a um sujeito (por exemplo, um paciente com um distúrbio autoimune) de um anticorpo anti-FcRn, conjugado com um marcador detectável; (ii) a exposição do sujeito a um meio para detectar o referido marcador detectável aos tecidos ou células expressando o FcRn. Por exemplo, é criada uma imagem do sujeito, por exemplo, por NMR ou outros meios tomográficos.

[00250] Exemplos de marcadores úteis para o diagnóstico por imagem incluem radio-marcadores, como ^{131}I , ^{111}In , ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{32}P , ^{125}I , ^3H , ^{14}C , e ^{188}Rh , marcadores fluorescentes, tais como fluoresceína e rodamina, marcadores ativos de ressonância magnética nuclear, pósitron emitindo isótopos detectáveis por uma tomografia de emissão positrônica ("PET"), quimioluminescentes, como luciferina e marcadores enzimáticos, tais como a peroxidase ou fosfatase. Emissores de radiação de curto alcance, como os isótopos detectáveis por sondas de detector de curto alcance também podem ser empregados. Os anticorpos podem ser marcados com esses reagentes, usando as técnicas conhecidas. Por exemplo, vide Wensel and Meares, 1983, *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, New York para técnicas relacionadas à radiomarcagem de anticorpos e D. Colcher et al,

1986, Meth. Enzymol. 121: 802 816.

[00251] Um anticorpo radiomarcado também pode ser usado para testes diagnósticos *in vitro*. A atividade específica de um anticorpo marcado isotopicamente depende da meia-vida, da pureza isotópica do marcador radioativo, e de como o marcador é incorporado ao anticorpo.

[00252] Os procedimentos para marcação de polipeptídeos com os isótopos radioativos (tais como ^{14}C , ^3H , ^{35}S , ^{125}I , ^{32}P , ^{131}I) são geralmente conhecidos. Por exemplo, os procedimentos de marcação de trítio são descritos na Patente U.S. Nº 4.302.438. Iodinização, marcação com trítio e procedimentos de marcação com ^{35}S , por exemplo, como adaptado para os anticorpos monoclonais murinos, são descritos, por exemplo, por Goding, J.W. (Monoclonal antibodies: principles and practice: production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry, and immunology 2nd ed. London; Orlando: Academic Press, 1986. pp 124 126) e referências citadas nele. Outros procedimentos para a iodinação de polipeptídeos, tais como anticorpos, são descritos por Hunter and Greenwood, 1962, Nature 144:945, David et al, 1974, Biochemistry 13: 1014 1021 e Patentes U.S. Nºs. 3.867.517 e 4.376.110. Os elementos de radiomarcagem que são úteis na geração de imagens incluem ^{123}I , ^{131}I , ^{111}In e $^{99\text{m}}\text{Tc}$, por exemplo. Os procedimentos para a iodinação de anticorpos são descritos por Greenwood, F. et al., 1963, Biochem. J. 89: 114 123; Marchalonis, J., 1969, Biochem. J. 113:299 305; and Morrison, M. et al., 1971, Immuno chemistry 289 297.

[00253] Os procedimentos para a marcação com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ são descritos por Rhodes, B. et al. in Burchiel, S. et al. (eds.), Tumor Imaging: The Radioimmunochemical Detection of Cancer, New York: Masson 111 123 (1982) e as referências citadas neles. Os procedimentos adequados para os anticorpos de marcação com ^{111}In são descritos por Hnatowich, D.J. et al., 1983, J. Immunol. Methods, 65: 147 157, Hnatowich, D. et al., 1984, J. Applied Radiation, 35:554 557, e Buckley, R. G. et al.,

1984, F.E.B.S. 166:202 204.

[00254] No caso de um anticorpo radiomarcado, o anticorpo administrado ao paciente, é localizado em células portando o antígeno com o qual o anticorpo reage, e é detectado ou "tem uma imagem gerada" *in vivo*, usando as técnicas conhecidas, como escaneamento radionuclear usando, por exemplo, uma câmara gama ou tomografia por emissão. Vide, por exemplo, A.R. Bradwell et al., "Developments in Antibody Imaging", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin et al., (eds.), pp 65 85 (Academic Press 1985). Alternativamente, um leitor de tomografia transaxial de emissão positrônica, conforme denominado Pet VI localizado no Brookhaven National Laboratory, pode ser usado onde a radiomarcagem emite os pósitrons (por exemplo, ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O e ^{13}N).

[00255] **Agentes de Contraste de MRI.** A Imagem por Ressonância Magnética (MRI) usa a NMR para visualizar as características internas do sujeito vivo e é útil para o prognóstico, diagnóstico, tratamento e cirurgia. A MRI pode ser usada sem os compostos de marcador radioativo para benefício óbvio. Algumas técnicas de MRI estão resumidas em EP-A-0 502 814. Geralmente, as diferenças relacionadas às constantes de tempo de relaxamento T1 e T2 de prótons da água em diferentes ambientes são usadas para gerar uma imagem. No entanto, essas diferenças podem ser insuficientes para fornecer imagens nítidas de alta resolução.

[00256] As diferenças nessas constantes de tempo de relaxamento podem ser aumentadas, por agentes de contraste. Os exemplos desses agentes de contraste incluem um número de agentes magnéticos e agentes paramagnéticos (que principalmente alteram T1) e ferromagnético ou superparamagnético (que principalmente alteram a resposta de T2). Quelatos (por exemplo, quelatos de EDTA, DTPA e NTA) podem ser usados para anexar (e reduzir a toxicidade) de algumas substâncias paramagnéticas (por exemplo, Fe^{+3} , Mn^{+2} , Gd^{+3}). Outros

agentes podem estar na forma de partículas, por exemplo, menos de 10 mm a cerca de 10 nM de diâmetro). As partículas podem ter propriedades ferromagnéticas, antiferromagnéticas ou superparamagnéticas. As partículas podem incluir, por exemplo, magnetita (Fe_3O_4), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, ferritas e outros compostos minerais magnéticos de elementos de transição. As partículas magnéticas podem incluir: um ou mais cristais magnéticos com e sem material não magnético. O material não magnético inclui polímeros sintéticos ou naturais (tais como sefrose, dextrano, dextrina, amido e similares).

[00257] O anticorpo de ligação ao FcRn também pode ser marcado com um grupo indicativo contendo o átomo ^{19}F NMR ativo, ou uma pluralidade de tais átomos na medida em que (i) substancialmente todos os átomos de flúor naturalmente abundantes são o isótopo ^{19}F e, assim, substancialmente todos os compostos contendo flúor são NMR ativos; (ii) muitos compostos polifluorados quimicamente ativos, como o anidrido trifluoracético são comercialmente disponíveis a um custo relativamente baixo; e (iii) muitos compostos fluorados foram descobertos clinicamente aceitáveis para uso em humanos, como os poliéteres perfluorados utilizados para transportar o oxigênio como substitutos da hemoglobina. Após permitir tal tempo de incubação, uma MRI de corpo inteiro é realizada, usando um aparelho como um daqueles descritos por Pykett, 1982, Sci. Am. 246:78 88 para localizar e gerar imagens de tecidos expressando o FcRn.

[00258] A divulgação também apresenta kits compreendendo um anticorpo que se liga ao FcRn e as instruções para uso diagnóstico, por exemplo, o uso de anticorpo de ligação ao FcRn ou de seu fragmento de ligação ao antígeno, para detectar o FcRn, *in vitro*, por exemplo, em uma amostra, por exemplo, uma biópsia ou células de um paciente com um distúrbio autoimune, ou *in vivo*, por exemplo, gerando a imagem de um sujeito. O kit pode ainda conter pelo menos um reagente adicional, como um marcador ou agente diagnóstico adicional. Para uso *in*

vivo, o anticorpo pode ser formulado como uma composição farmacêutica.

[00259] A presente invenção é ainda ilustrada pelos seguintes Exemplos, que de forma nenhuma devem ser interpretados como limitantes. Os conteúdos inteiros de todas as referências (incluindo as referências bibliográficas, patentes emitidas, pedidos de patente publicados e pedidos de patente co-pendentes) citadas por todo este pedido são expressamente incorporados para referência, em particular para o ensino daquilo que é referenciado acima.

EXEMPLO 1: DX2504 e seus Mutantes de Cisteína

[00260] A cadeia leve do anticorpo anti-FcRn DX-2504 tem uma cisteína não pareada na primeira posição da CDR3. Esta cisteína é adjacente à cisteína na FR3 que pareia com a cisteína na FRI das cadeias leves. Construímos dois mutantes que substituem a cisteína na CDR3 tanto com uma serina ou uma alanina. (Vide abaixo e vide também a Figura 9).

Mutantes

- 1) 532A-X 53-C02: mutante cys para ser
- 2) 532A-X 54-B03: mutante cys para ala

Alinhamento da Sequência das Cadeias Leves de DX-2504 (SEQ ID NO:8), 532A-X53-C02 (SEQ ID NO: 10), e 532A-X54-B03 (SEQ ID NO: 11)

	FR1-L	CDR1-L	FR2-L	CDR2-L
DX-2504:	QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTGSDVGSYNLVS	WYQQHPGKAPKLMY	GDSQRPS
532A-X53-C02	QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTGSDVGSYNLVS	WYQQHPGKAPKLMY	GDSQRPS
532A-X54-B03	QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTGSDVGSYNLVS	WYQQHPGKAPKLMY	GDSQRPS

	FR3-L	CDR3-L	FR4-L
DX-2504:	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYC	CSYAGSGIYV	FGTGTKVTVL
532A-X53-C02:	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYC	SSYAGSGIYV	FGTGTKVTVL
532A-X54-B03:	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYC	ASVYAGSGIYV	FGTGTKVTVL

Análise de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) de DX-2504, 532A-X53-C02 e 532-X54-B03

[00261] A pureza do anticorpo foi avaliada através da injeção de 50 µg de proteína sobre uma coluna Tosoh G3000 SWXL equilibrada em 0,2M de Fosfato

de Sódio, pH: 6,9 em um sistema Waters 2695 HPLC com detecção UV. Áreas de pico integradas foram expressas como % de monômero (isto é, anticorpo intacto), % de agregados de alto peso molecular (HMW) e % de espécies de baixo peso molecular (LMW) na Tabela 1. (Vide também a Figura 1).

Tabela 1. Resumo dos Resultados de SEC

Isolado	% de HMWA	% de Monômero	% de LMW
DX-2504	2.71	96.8	0.5
532A-X53-C02	1.23	98.8	NA
532A-X54-B03	1.62	98.4	NA

Análise de SDS-PAGE de DX-2504, 532A-X53-C02 e 532-X54-B03

[00262] Os anticorpos foram tratados com 50mM de N-etilmaleimida seguido por tampão da amostra de SDS-PAGE e aquecidos por 10 minutos a 72°C para bloquear o tiol livre que pode levar a artefatos do gel. O anticorpo (4 µg) foi carregado em um gel de NuPAGE de gradiente de 4-12% e corado com *Simply Blue Safe Stain*, antes da análise de densitometria usando um sistema UVP (Tabela 2). (Vide também a Figura 2)

Tabela 2. Resumo da Análise de Densitometria

Análise da Densitometria em Amostras em mAb não-reduzidas			
I.D. da Banda	DX-2504	532A-X54-B03	532A-X53-C02
2H/2L (Monômero)	81.6%	92.8%	92.4%
2H/1L	13.8%	6.5%	6.8%
2H	4.5%	0.7%	0.9%

Estabilidade da temperatura de DX-2504, 532A-X53-C02 e 532-X54-B03

[00263] As amostras DX-2504, C02-532A-X53 e 54 X-532-B03 foram incubadas a 37°C por 1 mês. As amostras foram colhidas em pontos de tempo diferentes para a análise usando a SEC analítica.

Estabilidade da temperatura de DX-2504 e de mutantes de cisteína é

apresentada com base na mudança no % de monômero. (Vide a Figura 3).

Estabilidade do pH de DX-2504, 532A-X53-C02 e 532-X54-B03

[00264] As amostras DX-2504, 532A-X53-C02 e 532-X54-B03 foram incubadas em condições de pH diferentes à temperatura ambiente por 1 mês. As amostras foram colhidas em pontos de tempo diferentes para a análise usando SEC analítica. A estabilidade do pH de DX-2504 e mutantes de cisteína é apresentada com base na mudança no % de monômero. (Vide a Figura 4).

Estabilidade de DX-2504, 532A-X53-C02 e 532-X54-B03 no pH 8,3

[00265] A estabilidade foi avaliada, usando SEC, conforme descrito no parágrafo acima da Tabela 1. A análise de SEC dos anticorpos no pH 8,3 é mostrada, uma vez que ela ilustra a estabilidade melhorada dos mutantes de cisteína sobre o DX-2504 na condição de pH testada. (Vide a Figura 5).

Titulação de tiol com DTNB

[00266] A presença de tióis de cisteína livres nas soluções de anticorpo purificado foi avaliada, reagindo 10 μ M do anticorpo com 10mM de DTNB (reagente de Ellman, ou 5, 5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico)) na presença ou ausência do reagente de desnaturação cloridrato de guanidina 6 M por 0,5 horas a 37°C antes de ler a absorbância da reação em 412 nm ($\epsilon = 14.100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A concentração de tiol foi dividida pela concentração do anticorpo para obter o mol tiol/mol do mAb. (Vide Tabela 3 abaixo).

Tabela 3. Resumo dos Dados da Titulação de Tiol

μ

Ensaio de DTNB - 10 M de mAb		
I.D. da Amostra	mAb de Tiol livre/mol Não Desnaturado	mAb de Tiol livre/mol Desnaturado
DX-2504	0.06	0.62
532A-X54-B03	0.05	0.31
532A-X53-C02	0.05	0.25

Estabilidade de DX-2504, 532A-X53-C02 e 532-X54-B03 para a desnaturação química.

[00267] A estabilidade da proteína de DX-2504 e dos mutantes de cisteína foi medida, monitorando a fluorescência intrínseca em função da concentração do desnaturante químico cloridrato de guanidina (GuHCl), 1 mg/ml de cada produto de anticorpo foi preparado com concentração diferente de 1 a 8M de GuHCl. A fluorescência foi medida e a razão de intensidade de 360/330 em função da concentração de GuHCl é representada graficamente. Os mutantes de cisteína mostram melhor estabilidade para as mudanças de conformação estrutural contra o reagente desnaturante. (Vide a Figura 6).

Análise da cinética da ressonância plasmônica de superfície (SPR ou Biacore) da interação de ofhFcRn com os DX-2504, 532A-X53-C02 e 532-X54-B03 imobilizados.

[00268] As medições de SPR foram realizadas, usando um Biacore 3000. DX-2504, 532A-X53-C02 e 532-X54-B03 foram imobilizados pelo acoplamento de amina nos chips do sensor CM5 em densidades de imobilização de -220 RU. Para medir os parâmetros cinéticos da interação de DX-2504 com o analito de FcRn, diluições seriadas duplicadas, preparadas a partir de 100 nM de FcRn, foram injetadas em duplicata por 5 min em 50 1/min com uma fase de dissociação de 15 minutos. A superfície do chip do sensor foi regenerada com um pulso de 30 seg. de glicina 10mM, pH 1,5 a uma taxa de fluxo de 75 1/min, seguido por um pulso 15

segundos do tampão. As medições foram realizadas a 25°C, usando HBS-P como o tampão de corrida. A célula de fluxo de referência foi ativada e bloqueada em uma reação de acoplamento de amina simulada. Os dados foram ajustados para um modelo de ligação 1: 1 usando o software de Biaevaluation v.4.1. (Vide Tabela 4, Figura 7 e Figura 8).

	Amostra	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
pH 6.0	532A-X54-B03	1.7×10^5	3.1×10^{-4}	1.8
	532A-X53-C02	3.1×10^5	4.3×10^{-4}	1.4
	DX-2504 lot 040709	2.4×10^5	3.5×10^{-4}	1.5
pH 7.5	532A-X54-B03	1.1×10^5	2.2×10^{-4}	2.0
	532A-X53-C02	1.9×10^5	3.2×10^{-4}	1.7
	DX-2504 lot 040709	1.5×10^5	2.8×10^{-4}	1.9

Tabela 4. Resumo dos Resultados de SPR

EXEMPLO 2: Mutante de Deleção de DX-2504

[00269] A cadeia pesada do anticorpo anti-FcRn DX-2504 contém uma lisina na última posição (C-terminal) da cadeia pesada. Mutante DX-2507 (cadeia leve SEQ ID NO: 18, cadeia pesada SEQ ID NO: 19) contém a mesma cadeia leve como aquela do DX-2504 e uma cadeia pesada com mutação, que foi construída, deletando o resíduo de lisina C-terminal da cadeia pesada do DX-2504. Um alinhamento de sequência entre o fragmento C-terminal da cadeia pesada do DX-2504 (SEQ ID NO: 20) e aquele da cadeia pesada do DX-2507 (SEQ ID NO: 21) é mostrado abaixo:

DX-2504: SDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG**K**

DX-2507: SDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Perfil farmacológico e Perfil toxicocinético de DX-2504 e DX-2507 em Macacos Cynomolgus

Seis macacos cynomolgus fêmeas não expostos foram distribuídos para 2 grupos de dose, cada um consistindo em 3 animais. A Tabela 5 fornece um resumo do projeto do estudo. Todos os animais foram dosados com 20mg/kg do anticorpo

de teste via injeção subcutânea (SC) uma vez no Dia 0 do Estudo e no Dia 7 do Estudo. Os animais do Grupo 1 foram administrados com DX-2504 e os animais do Grupo 2 foram administrados com DX-2507. O sangue foi colhido de todos os animais nos seguintes pontos de tempo: Dia 0 (antes da dosagem e 2 e 12 horas pós-dose), Dias 1, 2, 3, 4, 5, 6, Dia 7 (antes da dosagem e 2 e 12 horas pós-dose), Dias 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 21, 24, 28, 31 e 35. As amostras de soro para a toxicocinética de DX-2504 e DX-2507 foram analisadas, usando um método ELISA qualificado (DRD-910-029). Os níveis totais de IgG dos macacos cynomolgus foram analisados, usando um método ELISA qualificado (DRD_910-033).

Tabela 5: Projeto do Estudo

Grupo	# de Animais	Ab de Teste	Nível da Dose (mg/kg/dose)	Via de Administração	Concentração da Dose (mg/mL)	Volume da Dose (mL/kg)
1	3	DX-2504	20	SC	18.2	1.10
2	3	DX-2507	20	SC	35.6	0.56

[00270] As concentrações séricas de DX-2504 foram detectadas a partir de 2 horas pós-dose no Dia 0 até o Dia 11 em 2 animais e no Dia 13 em um animal. As concentrações séricas de DX-2507 foram detectadas a partir de 2 horas pós-dose no Dia 0 até o Dia 11, no Dia 12 e no Dia 17 em animais individuais. Os resultados assim obtidos mostram que as concentrações séricas de DX-2507 eram muito maiores do que aquelas de DX-2504 nos animais de teste, indicando que DX-2507 foi mais estável *in vivo* do que o DX-2504. Figura 13.

Os níveis de IgG dos macacos cynomolgus foram reduzidos após a administração de DX-2504 e DX-2507 (Figura 14). Após a administração da dose do Dia 0, os níveis de IgG médios totais foram reduzidos para 42% e 33% dos níveis de base de pré-dose nos grupos de dose de DX-2504 e DX-2507, respectivamente. Antes da dose do Dia 7, os níveis de IgG médios totais aumentaram para 45% e 37% dos níveis de base de pré-dose nos mesmos grupos de tratamento. Após a administração da dose do Dia 7, os níveis de IgG médios totais foram reduzidos para

42% dos valores de base de pré-dose no grupo de DX-2504 e para 30% dos valores de base de pré-dose no grupo de DX-2507. Os níveis de IgG totais retornaram aos valores de base de pré-dose no Dia 13 nos animais tratados com DX-2504 e no Dia 21 nos animais tratados com DX-2507.

[00271] Os parâmetros toxicocinéticos médios para DX-2504 e DX-2507 estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6: Parâmetros Toxicocinéticos Médios (SD)

Ab de Teste	Dia do Estudo	C _{máx} (ug/mL)	AUC _{última} (d*ug/mL)	CL/F (mL/d/Kg)	Vz/F (mL/Kg)	t _{1/2} (d)
DX-2504	0	51.9 (25.8)	70.8 (32.2)	341.0 (204.5)	879.1 (407.0)	1.9 (0.2)
	7*	32.0 (15.7)	47.5 (20.0)	492.3 (264.0)	312.4 (252.0)	0.4 (0.1)
DX-2507	0	75.3 (19.7)	135.6 (29.4)	152.0 (31.8)	74.1 (35.0)	0.3 (0.1)
	7*	71.6 (4.7)	120.3 (3.2)	166.3 (4.3)	73.6 (24.8)	0.3 (0.1)

*Os perfis de concentração sérica foram corrigidos para as concentrações de base de pré-dose (Dia 7)

[00272] Os parâmetros toxicocinéticos para DX-2504 e DX-2507 foram substancialmente consistentes nos dias 0 e 7. A exposição global do DX-2507 foi maior do que aquela observada para DX-2504. A concentração máxima média (C_{máx}) e os valores da curva concentração-tempo de plasma/soro (AUC_{última}) para DX-2507 no Dia 0 ou Dia 7 dia foram de 2 a 3 vezes maiores do que os valores correspondentes calculados para DX-2504. Além disso, a depuração aparente média correspondente (CL/F) e os valores de volume de distribuição (Vz/F) para DX-2504 estavam entre 2 a 12 vezes maiores do que aqueles para DX-2507.

Equivalências

[00273] A especificação escrita acima é considerada ser suficiente para permitir que uma pessoa versada na técnica pratique a invenção. A presente invenção não deve ser limitada no escopo pelos exemplos fornecidos, uma vez que os exemplos destinam-se a ser uma simples ilustração de um aspecto da invenção e

outras modalidades funcionalmente equivalentes estão dentro do escopo da invenção. Várias modificações da invenção além daquelas mostradas e descritas neste documento se tornarão evidentes para aqueles versados na técnica a partir da descrição anterior e estarão dentro do escopo das reivindicações anexas. As vantagens e os objetos da invenção não são necessariamente englobados por cada modalidade da invenção.

[00274] Os conteúdos de todas as referências, patentes e pedidos de patente publicados citados ao longo deste pedido estão incorporados neste documento em sua totalidade para referência, especificamente para o uso ou assunto aqui mencionados.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo anti-FcRn isolado que se liga ao FcRn humano, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo compreende uma região variável de cadeia leve (V_L) e uma região variável de cadeia pesada (V_H), em que

a V_L compreende:

(i) uma V_L CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos TGTGSDVGSYNLVS (SEQ ID NO:14);

(ii) uma V_L CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos GDSQRPS (SEQ ID NO:15); e

(iii) uma V_L CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos SSYAGSGIYV (SEQ ID NO:12) ou ASYAGSGIYV (SEQ ID NO:13); e

a V_H compreende:

(i) uma V_H CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos EYAMG (SEQ ID NO:22);

(ii) uma V_H CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos SIGSSGGQTKYADSVKG (SEQ ID NO:23); e

(iii) uma V_H CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos LAIGDSY (SEQ ID NO:24).

2. Anticorpo anti-FcRn isolado, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a V_L do anticorpo isolado compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 ou SEQ ID NO: 11.

3. Anticorpo anti-FcRn isolado, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 17 sem o resíduo de lisina C-terminal.

4. Anticorpo anti-FcRn isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo isolado se liga ao FcRn humano com uma constante de dissociação (K_D) menor que 10 nM.

5. Anticorpo anti-FcRn isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo isolado é um anticorpo de comprimento completo.

6. Anticorpo anti-FcRn isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo isolado é um anticorpo humano ou humanizado ou é não imunogênico em um ser humano.

7. Anticorpo anti-FcRn isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo isolado compreende uma região de estrutura de anticorpo humano.

8. Anticorpo anti-FcRn isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo isolado é um anticorpo murino.

9. Anticorpo anti-FcRn isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo isolado é quimérico.

10. Anticorpo anti-FcRn isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e 6 a 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo isolado é selecionado do grupo que consiste em Fab, F(ab)'₂, Fv e scFv.

11. Anticorpo anti-FcRn isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo isolado é um anticorpo monoclonal.

12. Composição farmacêutica **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o anticorpo anti-FcRn, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, e um veículo farmacêuticamente aceitável.

13. Ácido nucleico isolado **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma sequência de nucleotídeo que codifica o anticorpo anti-FcRn, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

14. Vetor **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende o ácido nucleico, como definido na reivindicação 13.

15. Célula de bactéria ou de levedura **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o vetor, como definido na reivindicação 14.

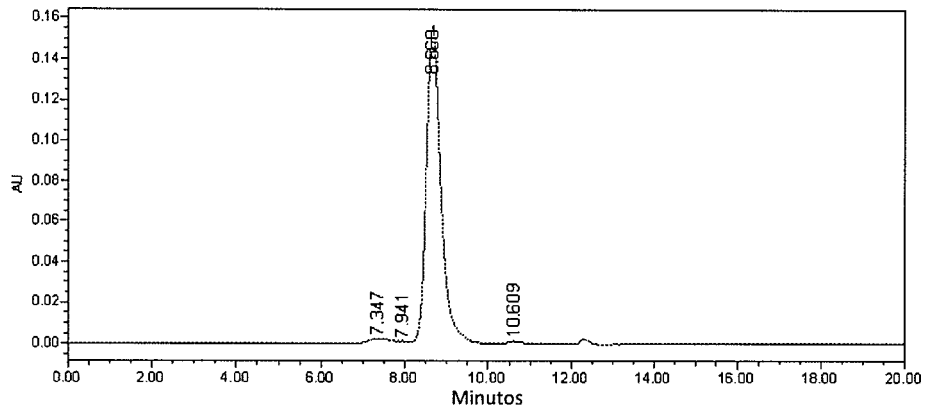
16. Uso do anticorpo anti-FcRn, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de uma composição para detectar um FcRn em uma amostra.

17. Uso do anticorpo anti-FcRn, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de uma composição para detectar um FcRn em um indivíduo.

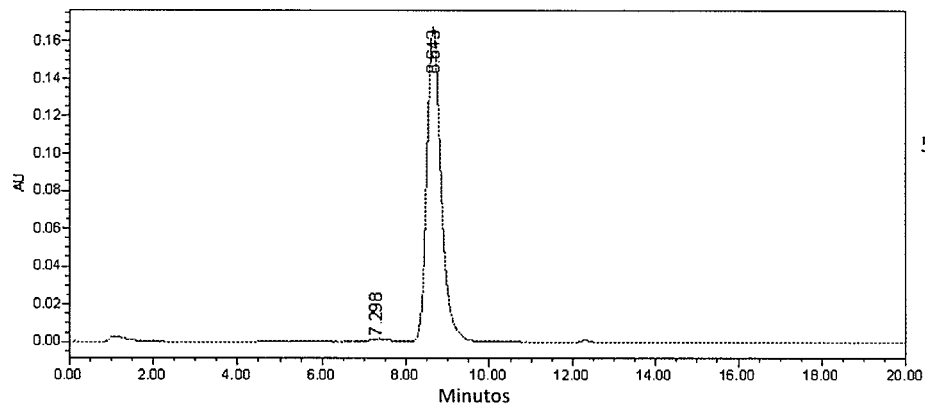
18. Uso do anticorpo anti-FcRn, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de uma composição para modular uma atividade de FcRn.

19. Uso do anticorpo anti-FcRn, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de uma composição para modular a meia vida/níveis de IgG circulantes em um indivíduo.

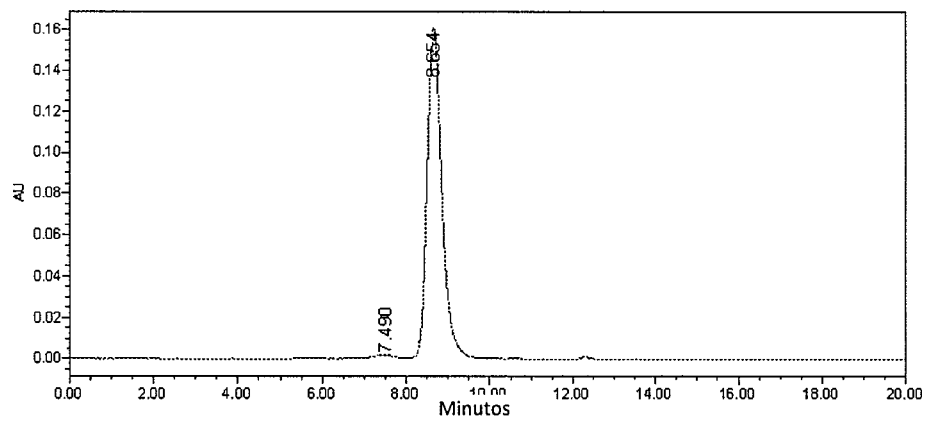
20. Uso do anticorpo anti-FcRn, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de uma composição para tratar uma doença autoimune.



DX-2504



532A-X53-C02



532A-X54-B03

Figura 1

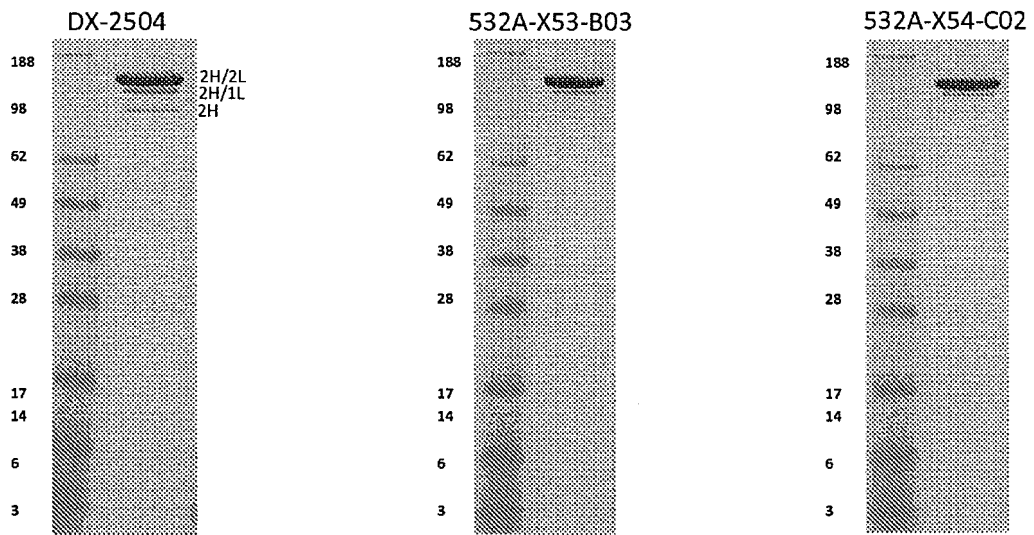
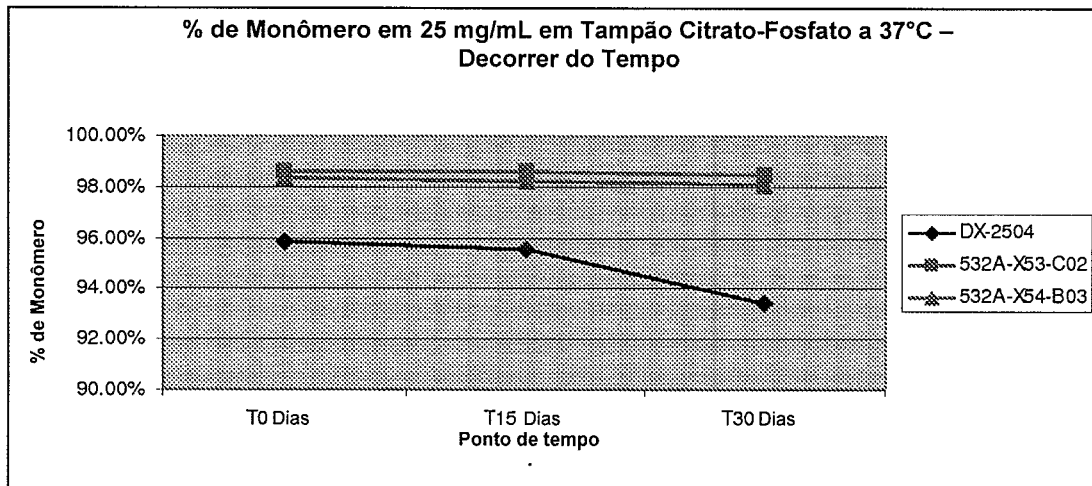
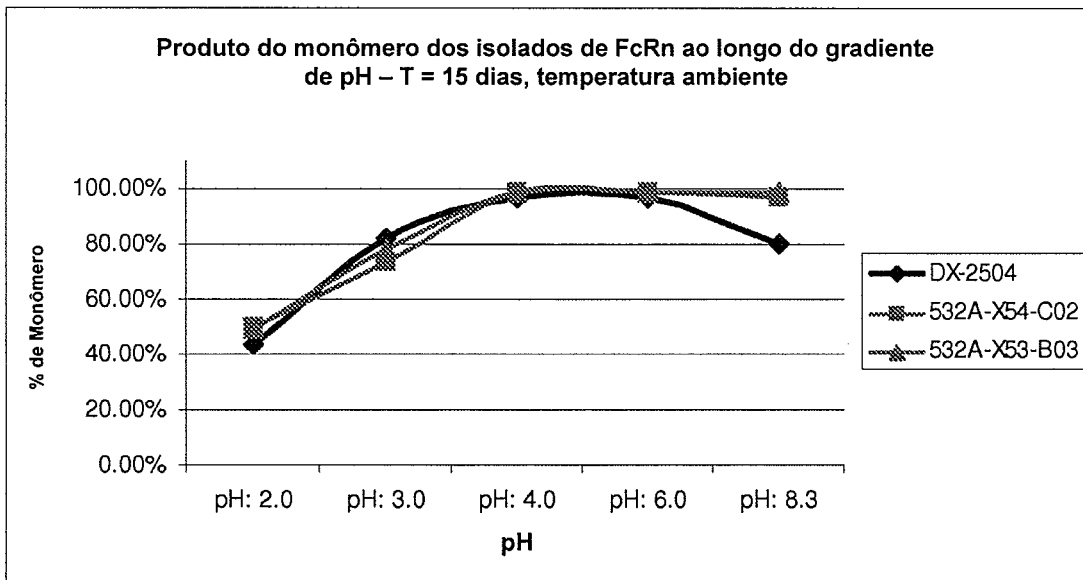
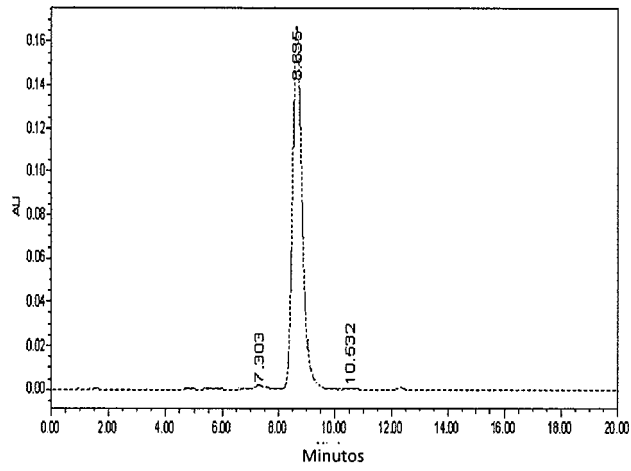


Figura 2

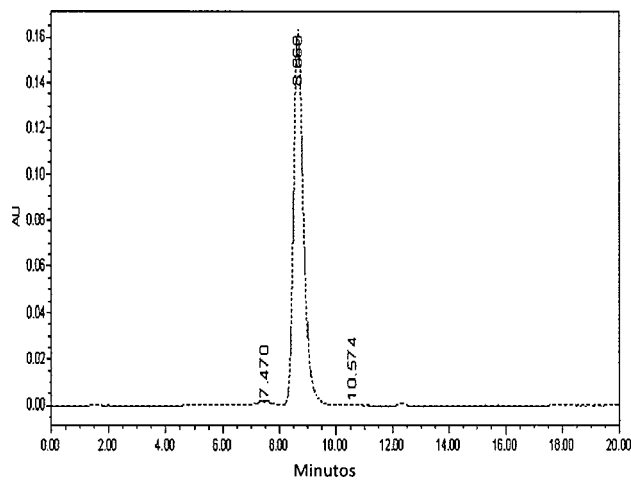
**Figura 3**

**Figura 4**

532A-X54-C02



532A-X53-B03



DX-2504

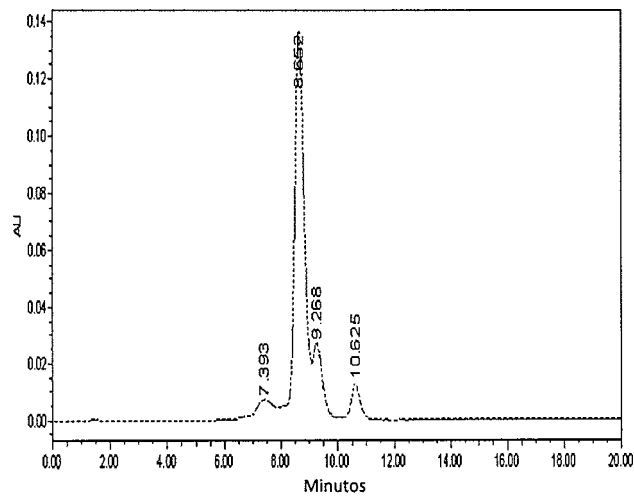


Figura 5

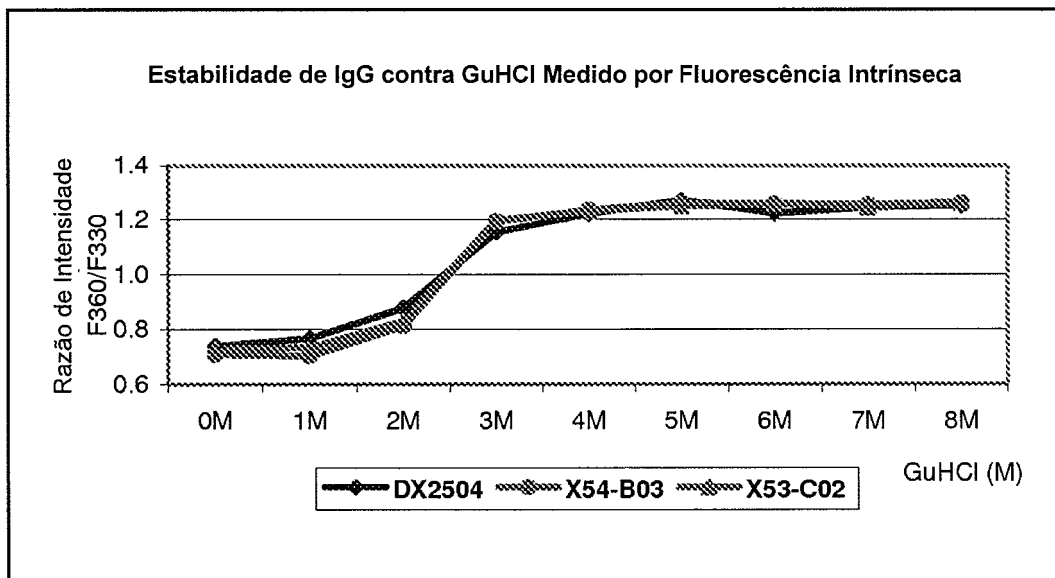


Figura 6

pH 6.0

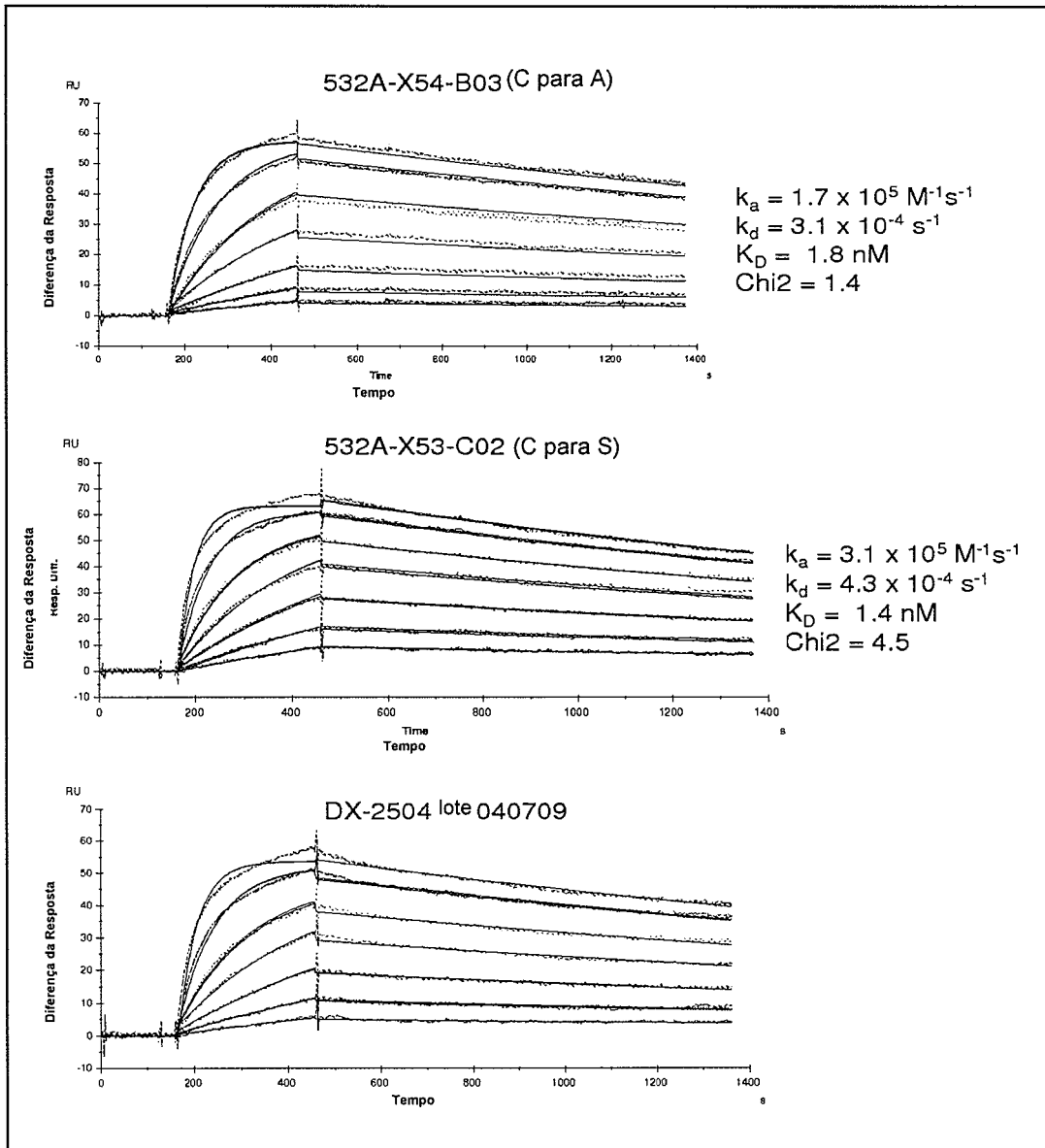


Figura 7

pH 7.5

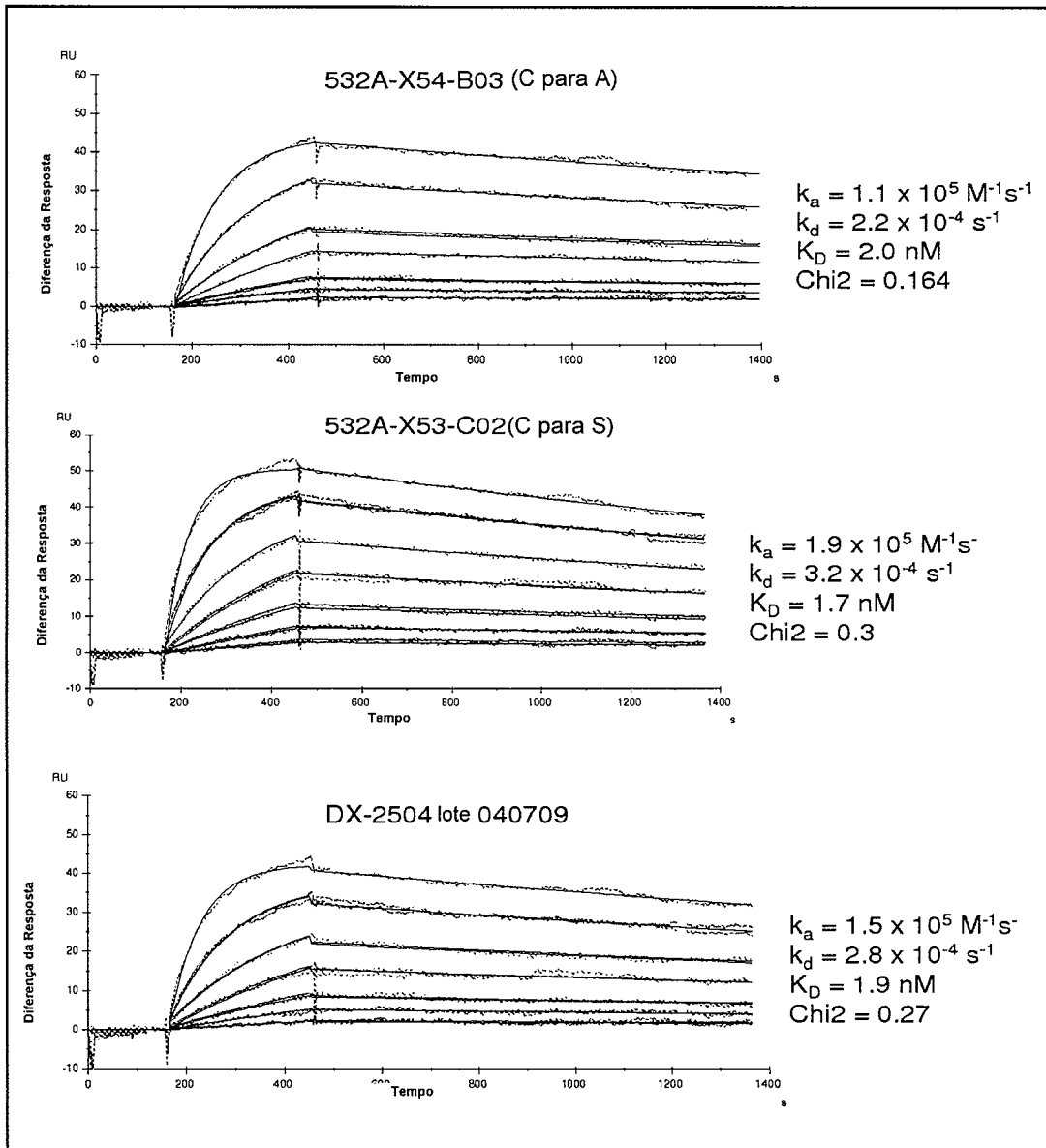


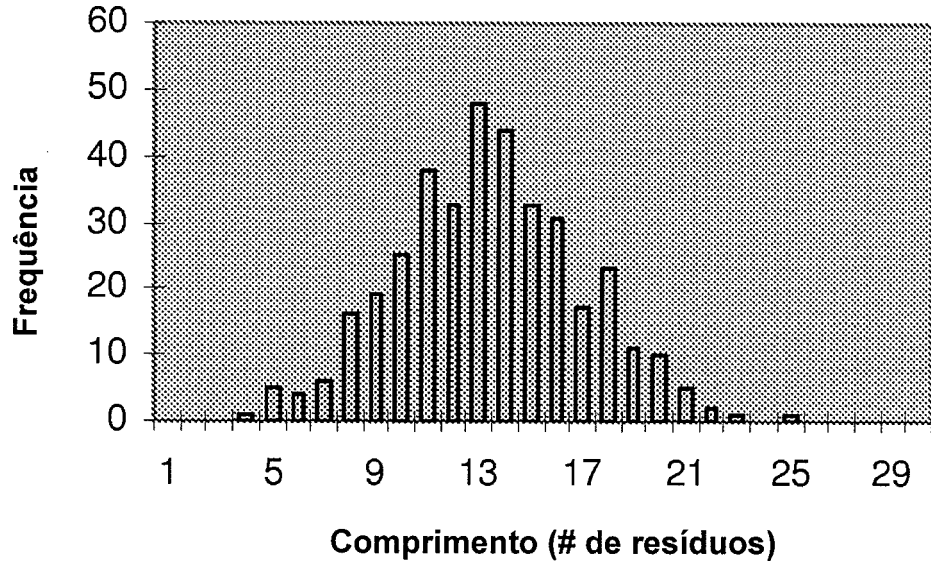
Figura 8

	FR1-L	CDR1-L	FR2-L	CDR2-L
DX-2504:	QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTGSDVGSYNLVS	WYQQHPGKAPKLMIIY	GDSQRPS
532A-X53-C02	QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTGSDVGSYNLVS	WYQQHPGKAPKLMIIY	GDSQRPS
532A-X54-B03	QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTGSDVGSYNLVS	WYQQHPGKAPKLMIIY	GDSQRPS

	FR3-L	CDR3-L	FR4-L
DX-2504:	GVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	CSYAGSGIYV	FGTGTKVTVL
532A-X53-C02	GVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	SSYAGSGIYV	FGTGTKVTVL
532A-X54-B03	GVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	ASYAGSGIYV	FGTGTKVTVL

Figura 9

Distribuição do comprimento de H-CDR3 do Fab 310



Distribuição do comprimento de H-CDR3 do anti-FcRn

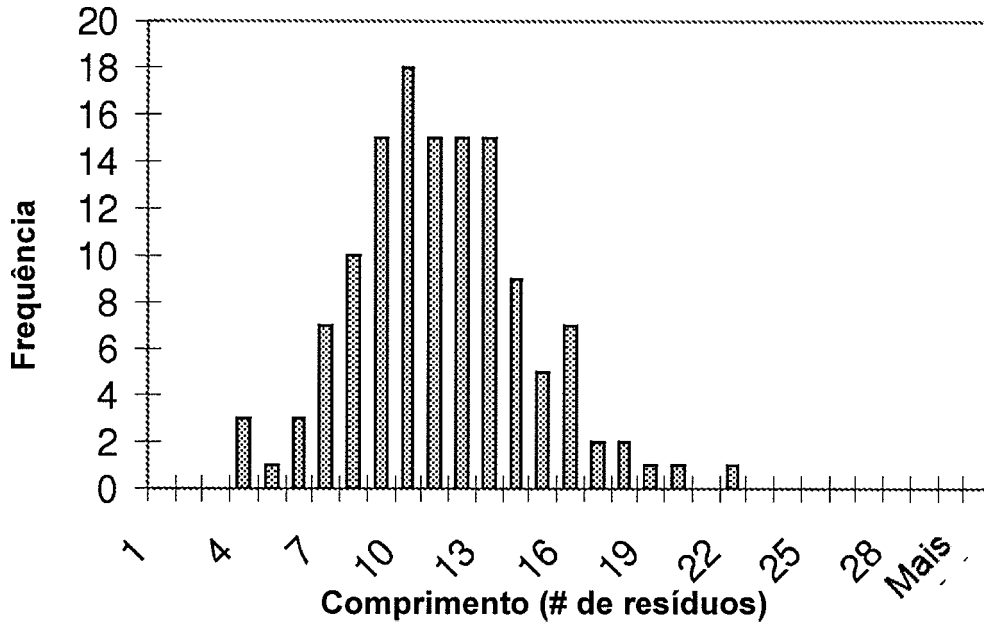


Figura 10

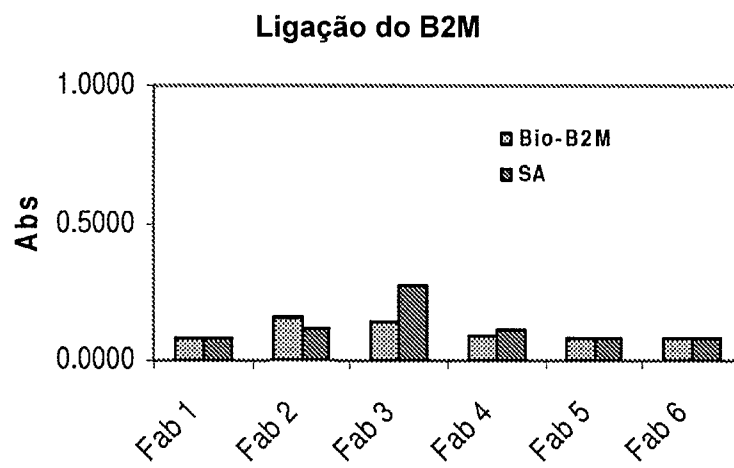
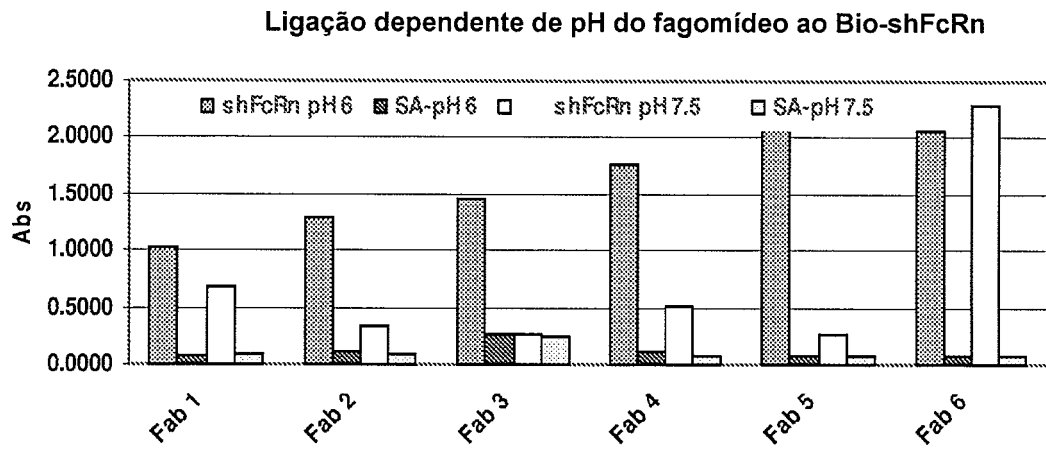


Figura 11

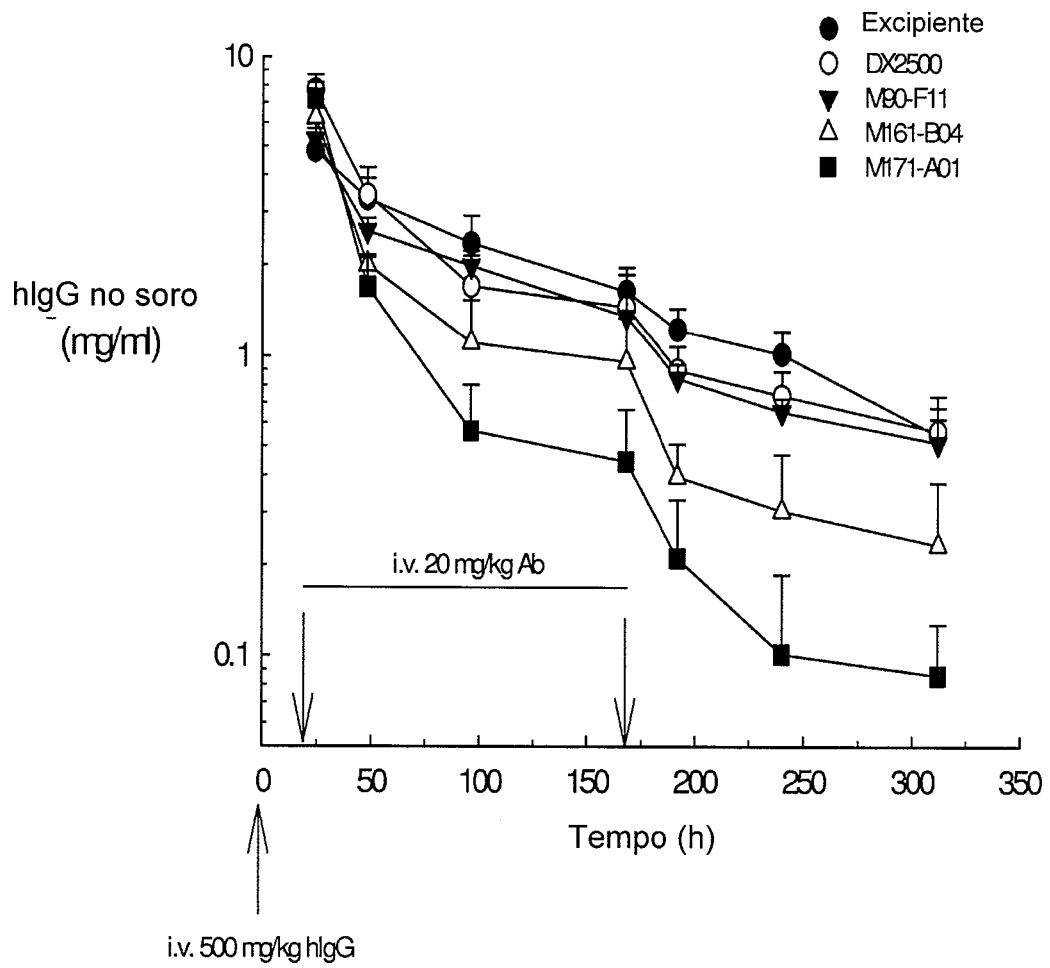


Figura 12

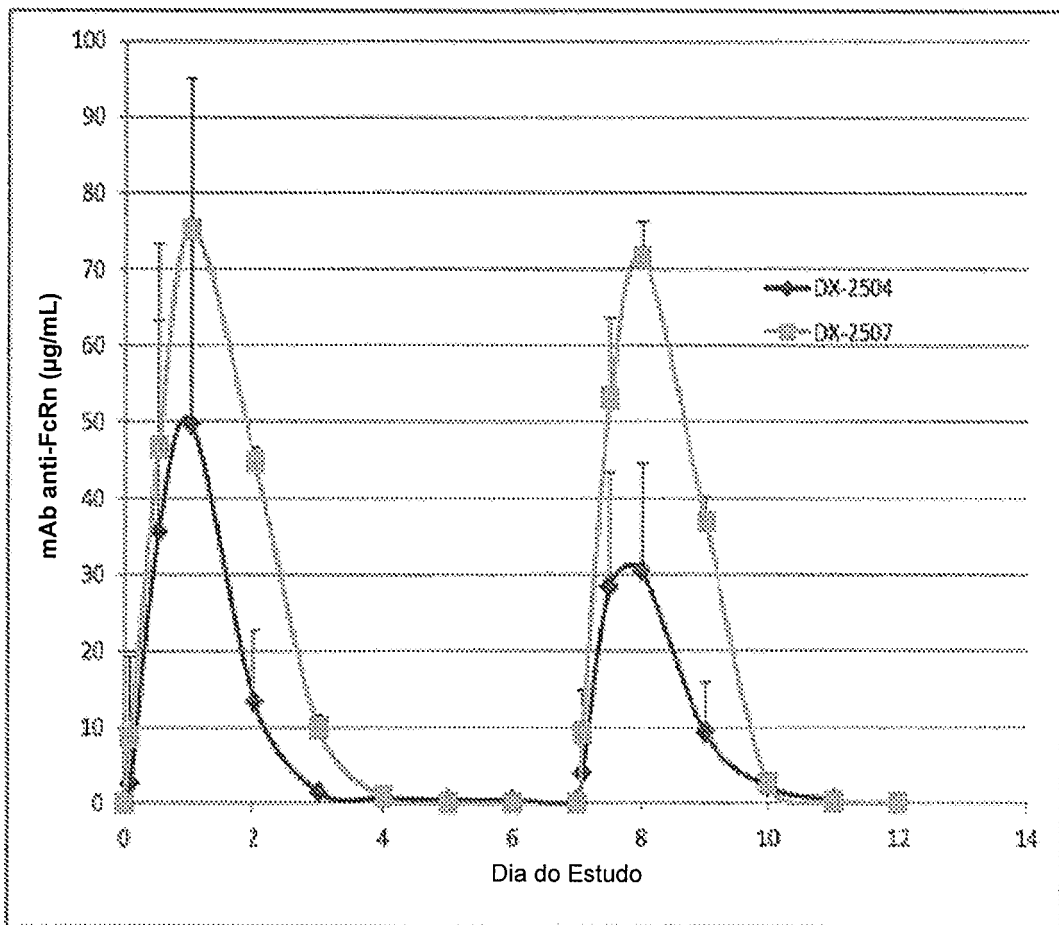


Figura 13

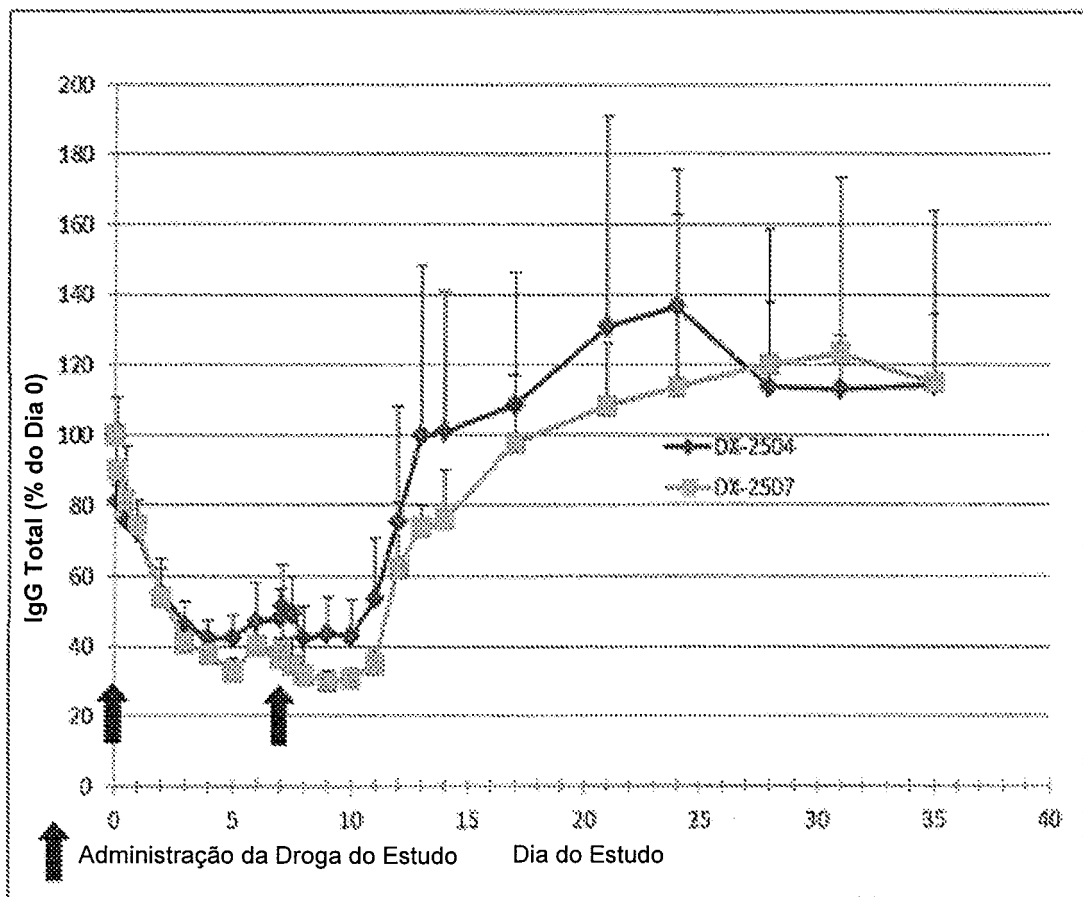


Figura 14