

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035324**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.28

(21) Номер заявки
201691304

(22) Дата подачи заявки
2014.12.23

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(54) АНТАГОНИСТЫ НЕОНАТАЛЬНЫХ Fc-РЕЦЕПТОРОВ (FCRN) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **61/920,547**

(32) **2013.12.24**

(33) **US**

(43) **2016.10.31**

(86) **PCT/US2014/072087**

(87) **WO 2015/100299 2015.07.02**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АРДЖЕНКС БВБА (BE); ДЗЕ
БОРД ОФ РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕХАС
СИСТЕМ (US)**

(72) Изобретатель:
**Ульрихтс Петер, Бланшето Кристоф,
Дрейер Торстен, Де Хард Йоханнес
(NL), Вард Обер Э. Салли (US),
Онгена Николас Г.Х. (NL)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A1-2013074598**

WO-A2-2006130834

WO-A2-2009100105

CARLOS VACCARO ET AL.: "Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate in vivo antibody levels", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 23, no. 10, 1 October 2005 (2005-10-01), pages 1283-1288, XP55049342, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt1143 the whole document

WO-A1-2010014909

WO-A2-2009131702

WO-A2-2010106180

US-B1-6277375

WO-A2-02060919

(57) Предоставлены новые композиции антагониста FcRn, включающие вариантный Fc-участок, который специфически связывается с FcRn с повышенной аффинностью и сниженной pH-зависимостью по сравнению с нативным Fc-участком. Также предоставлены антагонисты FcRn с усиленной аффинностью связывания с CD16. Также предоставлены способы лечения заболеваний, опосредованных антителами (например, аутоиммунных заболеваний), при помощи данных композиций антагониста FcRn, нуклеиновых кислот, кодирующих композиции антагониста FcRn, рекомбинантных экспрессионных векторов и клеток-хозяев для получения композиций антагониста FcRn, а также фармацевтических композиций, включающих композиции антагониста FcRn.

B1**035324****035324****B1**

Родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США с серийным номером 61/920,547, поданной 24 декабря 2013 года, которая включена в данную заявку во всей полноте посредством ссылки.

Уровень техники

Антитела иммуноглобулины гамма (IgG) играют ключевую роль в патологических процессах многих нарушений, таких как аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания и нарушения, в которых патологический процесс характеризуется избыточной экспрессией антител IgG (например, гипергаммаглобулинемия) (см., например, Jungans, *Immunologic Research* 16(1):29 (1997)).

Период полувыведения IgG из сыворотки крови пролонгирован относительно периода полувыведения из сыворотки крови других белков плазмы крови (Roopenian с соавт., *J. Immunology* 170:3528 (2003); Junghans и Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5512 (1996)). Такой длительный период полувыведения обеспечивается в некоторой степени связыванием Fc-участка IgG с Fc-рецептором, FcRn. Хотя FcRn изначально представляет собой неонатальный транспортный рецептор для материнских IgG, он также функционирует у взрослых, обеспечивая защиту IgG от распада. FcRn связывается с пиноцитированным IgG и защищает IgG от транспортировки в разрушающие лизосомы путем рециклинга его обратно во внеклеточный компартмент. Данный рециклинг облегчается путем pH-зависимого связывания IgG с FcRn, при котором взаимосвязь IgG/FcRn является более сильной при кислотном эндосомальном pH по сравнению с внеклеточным физиологическим pH.

Когда концентрация IgG в сыворотке крови достигает уровня, который превышает количество доступных молекул FcRn, несвязанные IgG оказываются незащищенными от разрушающих механизмов и будут, следовательно, иметь более короткий период полувыведения из сыворотки крови. Таким образом, ингибирование связывания IgG с FcRn уменьшает период полувыведения IgG из сыворотки крови путем предотвращения эндосомального рециклинга IgG. Соответственно, средства, которые представляют собой антагонисты связывания IgG с FcRn, могут быть полезными для регулирования, лечения или профилактики заболеваний, опосредованных антителами, таких, как аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний и т.д. Один из примеров способа антагонизирования функции связывания IgG Fc с FcRn включает образование блокирующих FcRn антител (см., например, WO2002/43658). Также определены пептиды, которые связывают и антагонизируют функцию FcRn (см., например, US6,212,022 и US8,101,186). В дополнение, полноразмерные антитела IgG, включающие варианты Fc-рецепторы с усиленным FcRn связыванием и сниженной pH-зависимостью, также были определены как антагонисты связывания FcRn с IgG (см., например, 8,163,881). Тем не менее, в области техники существует необходимость разработки улучшенных средств, которые антагонизируют связывание FcRn с IgG, для их применения в лечении заболеваний, опосредованных антителами.

Сущность

Настоящее раскрытие предоставляет новые композиции антагониста FcRn. Данные композиции в целом включают вариантный Fc-участок или его FcRn-связывающий фрагмент, который специфически связывается с FcRn, обладая повышенной аффинностью и сниженной pH-зависимостью по сравнению с нативным Fc-участком. Изобретение основывается в некоторой степени на неожиданных данных о том, что выделенный вариантный Fc-участок (например, вариантный Fc-участок, включающий аминокислоты Y, T, E, K, F и Y в положениях по системе EU (EU нумерация) 252, 254, 256, 433, 434 и 436, соответственно) является более эффективным антагонистом FcRn *in vivo* по сравнению с полноразмерным антителом, включающим данный вариантный Fc-участок. Композиции антагониста FcRn настоящего раскрытия являются в частности полезными в отношении снижения концентраций Fc-содержащих средств в сыворотке крови (например, антител и иммуноадгезинов). Соответственно, текущее раскрытие также предоставляет способы лечения заболеваний, опосредованных антителами (например, аутоиммунных заболеваний), при помощи раскрытых в данной заявке композиций антагонистов FcRn. Также предоставлены нуклеиновые кислоты, кодирующие композиции антагониста FcRn, рекомбинантные экспрессионные векторы и клетки-хозяева для получения композиций антагониста FcRn, а также фармацевтические композиции, включающие композиции антагониста FcRn.

Раскрытые в данной заявке антагонисты FcRn являются в частности более эффективными по сравнению с ранее описываемыми композициями антагониста FcRn и известными методами лечения заболеваний, опосредованных антителами. Например, раскрытые в данной заявке антагонисты FcRn меньше по размеру и более активны по сравнению с внутривенным гамма-глобулином (IVIg, ВВИГ), текущим препаратом для лечения многих заболеваний, опосредованных антителами. Соответственно, эффективная доза раскрытых антагонистов FcRn может быть значительно ниже, чем таковая для ВВИГ. Более того, ВВИГ выделен и очищен от людей-доноров и, как следствие, страдает от множественных вариаций внутри серии. Раскрытые в данной заявке композиции антагонистов FcRn могут быть созданы при помощи генной инженерии или химически синтезированы и, таким образом, могут быть намного более однородными. Как продемонстрировано в данной заявке, раскрытые в данной заявке антагонисты FcRn также неожиданно являются более эффективными по сравнению с полноразмерными антителами IgG, включающими варианты Fc-рецепты, как изложено у Vaccaro с соавт., *Nature Biotech* 23(9) 1283-1288

(1997).

Соответственно, в одном аспекте настоящее раскрытие предоставляет выделенный антагонист FcRn, включающий вариантный Fc-участок или его FcRn-связывающий фрагмент, где Fc-участок или фрагмент включает аминокислоты Y, T, E, K, F и Y в положениях по системе EU 252, 254, 256, 433, 434 и 436, соответственно, и где антагонист FcRn не является полноразмерным антителом.

В некоторых вариантах осуществления антагонист FcRn не включает вариабельный участок анти-тела или CH1 домен. В некоторых вариантах осуществления антагонист FcRn не включает свободный цистеиновый остаток. В некоторых вариантах осуществления Fc-участок представляет собой Fc-участок IgG (например, Fc-участок IgG человека). В некоторых вариантах осуществления Fc-участок представляет собой Fc-участок IgG1 (например, Fc-участок IgG1 человека). В некоторых вариантах осуществления Fc-участок представляет собой химерный Fc-участок.

В некоторых вариантах осуществления антагонист FcRn включает вариантный Fc-участок с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления антагонист FcRn включает вариантный Fc-участок, где аминокислотная последовательность Fc-доменов вариантного Fc-участка состоит из аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 1, 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления антагонист FcRn состоит из вариантного Fc-участка, где аминокислотная последовательность Fc-домена вариантного Fc-участка состоит из аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления антагонист FcRn включает вариантный Fc-участок, который имеет отличную (повышенную или сниженную) аффинность к Fc-рецептору по сравнению с аффинностью Fc-участка IgG1 дикого типа для Fc-гамма рецептора. В некоторых вариантах осуществления вариантный Fc обладает повышенной аффинностью к CD16a.

В некоторых вариантах осуществления антагонист FcRn включает вариантный Fc-участок, который не включает N-связанный гликан в положении 297 по системе EU. В некоторых вариантах осуществления антагонист FcRn включает вариантный Fc-участок, который включает афукозилированный N-связанный гликан в положении 297 по системе EU. В некоторых вариантах осуществления антагонист FcRn включает вариантный Fc-участок, который включает N-связанный гликан, имеющий N-ацетил-D-глюкозамин в точках ветвления в положении 297 по системе EU.

В некоторых вариантах осуществления антагонист FcRn включает вариантный Fc-участок, связанный с удлинителем периода полувыведения. В некоторых вариантах осуществления удлинитель периода полувыведения представляет собой полиэтиленгликоль или сывороточный альбумин человека. В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие предоставляет композицию антагониста FcRn, включающую множество молекул антагониста FcRn, раскрытого в данной заявке, где по меньшей мере 50% (опционально, по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 95 или 99%) молекул включают вариантный Fc-участок или его FcRn-связывающий фрагмент, имеющий афукозилированный N-связанный гликан. В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие предоставляет композицию антагониста FcRn, включающую множество молекул антагониста FcRn, раскрытого в данной заявке, где по меньшей мере 50% (опционально, по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 95 или 99%) молекул включают вариантный Fc-участок или его FcRn-связывающий фрагмент, включающий афукозилированный N-связанный гликан, имеющий N-ацетил-D-глюкозамин в точках ветвления.

В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие предоставляет композицию антагониста FcRn, включающую множество молекул антагониста FcRn, как раскрыто в данной заявке, где более 95% молекул антагониста FcRn в композиции представляют собой мономеры (например, более 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9%).

В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие предоставляет композицию антагониста FcRn, включающую множество молекул антагониста FcRn, раскрытого в данной заявке, где менее 5% молекул антагониста FcRn в композиции находятся в виде агрегатов (например, менее 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1%).

В некоторых вариантах осуществления текущее раскрытие предоставляет композицию антагониста FcRn, включающую множество молекул антагониста FcRn, раскрытого в данной заявке, где композиция практически не содержит продукты распада молекулы антагониста FcRn.

В другом аспекте текущее раскрытие предоставляет фармацевтические композиции, включающие антагониста FcRn или композицию антагониста FcRn, раскрытую в данной заявке, а также фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

В другом аспекте текущее раскрытие предоставляет способ ингибирования функции FcRn у субъекта, где способ включает введение субъекту эффективного количества раскрытой в данной заявке композиции антагониста FcRn.

В другом аспекте текущее раскрытие предоставляет способ снижения концентраций Fc-содержащего средства в сыворотке крови у субъекта, которому вводили Fc-содержащее средство, способ, включающий введение субъекту эффективного количества раскрытой в данной заявке композиции антагониста FcRn. В некоторых вариантах осуществления Fc-содержащее средство представляет собой анти-тело или иммуноадгезин. В некоторых вариантах осуществления Fc-содержащее средство представляет

собой терапевтическое или диагностическое средство. В некоторых вариантах осуществления Fc-содержащее средство представляет собой радиофармацевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления Fc-содержащее средство представляет собой конъюгат антитела с лекарственным средством.

В другом аспекте настоящее раскрытие предоставляет способ лечения заболеваний, опосредованных антителами, у субъекта, способ, включающий введение субъекту эффективного количества композиции антагониста FcRn, раскрытой в данной заявке. В некоторых вариантах осуществления заболевание, опосредованное антителами, представляет собой гиперглобулинемию. В некоторых вариантах осуществления заболевание, опосредованное антителами, представляет собой заболевание или нарушение, которые лечится при помощи внутривенного иммуноглобулина (ВВИГ). В некоторых вариантах осуществления заболевание, опосредованное антителами, представляет собой заболевание или нарушение, которые лечится при помощи плазмафереза и/или иммуносорбции.

В некоторых вариантах осуществления заболевание, опосредованное антителами, представляют собой аутоиммунное заболевание. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание выбирают из группы, состоящей из отторжения аллогенного островкового трансплантата, очаговой алопеции, анкилозирующего спондилита, антифосфолипидного синдрома, аутоиммунной Аддисоновой болезни, болезни Альцгеймера, антинейтрофильных цитоплазматических антител (ANCA), аутоиммунных заболеваний надпочечников, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного миокардита, аутоиммунной нейтропении, аутоиммунного оофорита или орхита, аутоиммунной тромбоцитопении, аутоиммунной крапивницы, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, кардиомиопатии, болезни Кастлемана, дерматита спруцелиаксии, синдрома хронической усталости и иммунной дисфункции, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIDP), синдрома Черджа-Стросс, рубцового пемфигоида, синдрома Тибьержа-Вайсенбаха, болезни холодовых агглютининов, болезни Крона, дерматомиозита, дилатационной кардиомиопатии, дискоидной волчанки, приобретенного буллезного эпидермолиза, идиопатической криоглобулинемии смешанного типа, недостаточности фактора VIII, фибромиалгии-фибромиозита, гломерулонефрита, диффузного токсического зоба, синдрома Гийена-Барре, синдрома Гудпасчера, болезни трансплантат против хозяина (GVHD, БТПХ), тиреоидита Хашимото, гемофилии А, идиопатической мембранозной нейропатии, идиопатического легочного фиброза, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП, ИТП), IgA нейропатии, IgM полинейропатии, иммуно-опосредованной тромбоцитопении, ювенильного артрита, синдрома Кавасаки, плоского лишая, склерозирующего лишая, красной волчанки, болезни Меньера, смешанной болезни соединительной ткани, пемфигоида слизистых оболочек, рассеянного склероза, сахарного диабета I типа, мультифокальной моторной нейропатии (MMN), миастении gravis, паранеопластического буллезного пемфигоида, пемфигоида беременных, вульгарного пемфигоида, эксфолиативного пемфигоида, пернициозной анемии, нодозного полиартериита, полихондрии, полигландулярного синдрома, ревматической полимиалгии, полимиозита и дерматомиозита, первичной агаммаглобулинемии, первичного билиарного цирроза, псориаза, псориатического артрита, рецидивирующего полихондрита, феномена Рейно, синдрома Рейтера, ревматоидного артрита, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, реакции отторжения солидного органа, синдрома мышечной скованности, системной красной волчанки, синдрома Такаюсу, токсического эпидермального некролиза (TEN, ТЭН), синдрома Стивенса-Джонсона (SJS), височного артериита/гигантоклеточного артериита, тромботической тромбоцитопенической пурпуры, язвенного колита, увеита, герпетического дерматита, васкулита, ассоциированного с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами, витилиго и гранулематоза Вегенера.

В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой аутоиммунную каналопатию. В некоторых вариантах осуществления каналопатию выбирают из группы, состоящей из аутоиммунного энцефалита с поражением лимбической системы, эпилепсии, нейромиеелита зрительного нерва, миастенического синдрома Ламберта-Итона, миастении gravis, энцефалита с антителами к N-метил-D-аспаратным (NMDA) рецепторам, энцефалита с антителами к рецепторам α -амино-3-гидроксипропан-5-метил-4-изоксазолепропионовой кислоты (AMPA), синдрома Морвана, нейромиеотонии, детских аутоиммунных психоневрологических заболеваний, ассоциированных со стрептококковой инфекцией (PANDAS) и болезни глициновых рецепторов, ассоциированной с антителами.

В некоторых вариантах осуществления антагонист FcRn вводят субъекту одновременно с дополнительным лекарственным средством или после него. В некоторых вариантах осуществления дополнительное лекарственное средство представляет собой противовоспалительное средство. В некоторых вариантах осуществления дополнительное лекарственное средство представляет собой ритуксимаб, даклизумаб, базиликсимаб, муромонаб-сд3, инфликсимаб, адалимумаб, омализумаб, эфализумаб, натализумаб, тоцилизумаб, экулизумаб, голимумаб, канакинумаб, устекинумаб или белимумаб. В некоторых вариантах осуществления дополнительное лекарственное средство представляет собой средство, истощающие лейкоциты. В некоторых вариантах осуществления дополнительное лекарственное средство представляет собой средство, истощающее В-клетки. В некоторых вариантах осуществления средство, истощающее В-клетки, представляет собой антитело, например, антитело, которое специфически связывается с CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD70, CD72, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b,

CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85 или CD86.

В другом аспекте текущее раскрытие предоставляет молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей раскрытый в данной заявке антагонист FcRn. В другом аспекте настоящее раскрытие предоставляет экспрессионный вектор или нуклеиновую кислоту, кодирующую раскрытый в данной заявке антагонист FcRn. В другом аспекте настоящее раскрытие предоставляет способ изготовления антагониста FcRn, способ, включающий культивирование клеток-хозяев, раскрытых в данной заявке, в условиях для экспрессирования антагониста FcRn.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 отображает результаты экспериментов для определения влияния Fc-Abdeg и HEL-Abdeg на концентрации помеченного радиоактивным изотопом антитела в сыворотке крови (FR70-hlgG1) у яванских макаков.

Фиг. 2 отображает результаты экспериментов для определения влияния Fc-Abdeg и HEL-Abdeg на общие концентрации IgG в сыворотке крови у яванских макаков.

Фиг. 3 отображает результаты экспериментов для определения влияния Fc-Abdeg и HEL-Abdeg на концентрации альбуминов у яванских макаков.

Фиг. 4 отображает результаты экспериментов для определения влияния Fc-Abdeg и ВВИГ на концентрации помеченного радиоактивным изотопом антитела (FR70-hlgG1) в сыворотке крови у яванских макаков.

Фиг. 5 отображает результаты анализов ИФА (ELISA) по сравнению аффинности Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT и Fc-Abdeg-S239D/I332E по отношению к CD16a человека.

Фиг. 6 отображает результаты анализов ИФА (ELISA) по сравнению аффинности Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT и Fc-Abdeg-S239D/I332E по отношению к CD16-2 мышей.

Фиг. 7 отображает результаты экспериментов для определения влияния Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT и Fc-Abdeg-S239D/I332E на анти-CD20-опосредованный ADCC сигнал при помощи биотеста по гену-репортеру на ADCC (антителозависимую клеточную цитотоксичность) Promega с клетками Raji.

Фиг. 8 отображает результаты экспериментов для определения влияния Fc-Abdeg и Abdeg-POT на анти-CD70-опосредованный лизис CD70+ U266 клеток *in vitro*.

Фиг. 9 отображает результаты экспериментов для определения влияния Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT, Fc-Abdeg-S239D/I332E и ВВИГ на содержание тромбоцитов на мышинной модели острой иммунной тромбоцитопении.

Фиг. 10 отображает результаты типичной очистки Fc-Abdeg при помощи гель-фильтрации.

Подробное описание

Настоящее раскрытие предоставляет новые композиции антагониста FcRn. Данные композиции в целом включают вариантный Fc-участок или его FcRn-связывающий фрагмент, который специфически связывается с FcRn с повышенной аффинностью и сниженной pH-зависимостью по сравнению с нативным Fc-участком. Изобретение отчасти основывается на неожиданных данных о том, что выделенный вариантный Fc-участок (например, вариантный Fc-участок, включающий аминокислоты Y, T, E, K, F и Y в положениях 252, 254, 256, 433, 434 и 436 по системе EU, соответственно) является более эффективным антагонистом FcRn *in vivo* по сравнению с полноразмерным антителом, включающим данный вариантный Fc-участок. Композиции антагониста FcRn настоящего раскрытия являются в частности полезными в отношении снижения уровней Fc-содержащих средств в сыворотке крови (например, антител и иммуноадгезинов). Соответственно, текущее раскрытие также предоставляет способы лечения заболеваний, опосредованных антителами (например, аутоиммунных заболеваний) при помощи раскрытых в данной заявке композиций антагонистов FcRn. Также предоставлены нуклеиновые кислоты, кодирующие композиции антагониста FcRn, рекомбинантные экспрессионные векторы и клетки-хозяева для получения композиций антагониста FcRn, а также фармацевтические композиции, включающие композиции антагониста FcRn.

I. Определения.

Если в данной заявке не указано иное, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, будут иметь значения, под которыми они обычно понимаются специалистами в данной области техники. Значение и объем терминов должны быть ясными, но тем не менее, в случае скрытой неясности определения, предоставленные в данной заявке, имеют преимущества над любыми значениями из словаря или значениями, лежащими вне данного документа. Дополнительно, если контекстом не предусмотрено иное, термины в единственном числе включают множественное число, а термины во множественном числе включают единственное число. В целом, описанная в данной заявке номенклатура, связанная с технологиями культуры клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики и белковой химии, химии нуклеиновых кислот, а также гибридизации, хорошо известна и широко применяется в данной области техники.

Для более быстрого понимания настоящего изобретения сначала даются определения некоторых терминов.

Как применяют в данной заявке, термин "антагонист FcRn" относится к любому средству, включающему Fc-участок (например, вариантный Fc-участок, раскрытый в данной заявке), который специфично

чески связывается с FcRn через Fc-участок и ингибирует связывание FcRn с иммуноглобулином при условии, что средство не является полноразмерным IgG антителом.

Как применяют в данной заявке, термин "Fc-участок" относится к части нативного иммуноглобулина, образуемой Fc-доменами двух его тяжелых цепей. Нативный Fc-участок является гомодимерным.

Как применяют в данной заявке, термин "вариантный Fc-участок" относится к Fc-участку с одним или более модификациями по сравнению с нативным Fc-участком. Модификации могут включать аминокислотные замещения, инсерции и/или делеции, присоединение дополнительных фрагментов и/или модификацию нативных гликанов. Термин включает гетеродимерные Fc-участки, где составляющие Fc-домены отличаются друг от друга. Примеры таких гетеродимерных Fc-участков включают без ограничений Fc-участки, полученные при помощи технологии "выступов и впадин", как описано, например, в US 8216805, который включен в данную заявку во всей полноте посредством ссылки. Термин также включает одноцепочечные Fc-участки, где составляющие их Fc-домены связаны между собой связывающими фрагментами, как описано, например, в US20090252729A1 и US20110081345A1, каждый из которых включен в данную заявку во всей полноте посредством ссылки.

Как применяют в данной заявке, термин "Fc-домен" относится к части одиночной тяжелой цепи иммуноглобулина, начинающейся от шарнирной области сразу против хода транскрипции от участка рестрикции папаина, и заканчивающейся на С-конце антитела. Соответственно, полноценный Fc-домен включает по меньшей мере часть шарнирного (например, верхний, средний и/или нижний шарнирный участок) домена, CH2-домен и CH3-домен.

Как применяют в данной заявке, термин "FcRn-связывающий фрагмент" относится к части Fc-участка, которой достаточно для обеспечения FcRn связывания.

Как применяют в данной заявке, термин "положение по системе EU" относится к положению аминокислоты в системе нумерации EU для Fc-участка, описанной у Edelman, G.M. с соавт., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969) и Kabat с соавт. в "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. Health and Human Services, 5th edition, 1991.

Как применяют в данной заявке, термин "CH1 домен" относится к первому (наиболее аминоконцевому) домену константного участка тяжелой цепи иммуноглобулина, который продолжается приблизительно от положений 118-215 по системе EU. CH1 домен расположен недалеко от VH домена и аминоконца шарнирной области молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина и не образует часть Fc-участка тяжелой цепи иммуноглобулина.

Как применяют в данной заявке, термин "шарнирная область" относится к части молекулы тяжелой цепи, которая соединяет CH1 домен с CH2 доменом. Данная шарнирная область включает приблизительно 25 остатков и является гибкой, таким образом обеспечивая независимую подвижность двух N-концевых антиген-связывающих участков. Шарнирные области можно подразделить на три отдельных участка: верхний, средний и нижний шарнирные домены (Roux с соавт. J Immunol. 161: 4083 (1998)). Антагонисты FcRn настоящего раскрытия могут включать всю шарнирную область или ее часть.

Как применяют в данной заявке, термин "CH2 домен" относится к участку тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина, который продолжается от приблизительно положений 231-340 по системе EU.

Как применяют в данной заявке, термин "CH3 домен" включает участок тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина, который имеет продолжительность приблизительно 110 остатков от N-конца CH2 домена, например, от приблизительно положений 341-446 (по системе нумерации EU).

Как применяют в данной заявке, термин "FcRn" относится к неонатальному Fc-рецептору. Типичные молекулы FcRn включают FcRn человека, закодированный FCGRT геном, как изложено в RefSeq NM_004107.

Как применяют в данной заявке, термин "CD16" относится к FcγRIII Fc-рецепторам, которые требуются для антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC, AЗКЦ). Типичные молекулы CD16 включают CD16a человека, как изложено в RefSeq NM_000569.

Как применяют в данной заявке, термин "свободный цистеин" относится к нативному или разработанному остатку аминокислоты цистеин, которая существует зрелом антагонисте FcRn в практически восстановленной форме.

Как применяют в данной заявке, термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулина, включающим четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные друг с другом при помощи дисульфидных связей, а также к их мультимерам (например, IgM). Каждая тяжелая цепь включает переменный участок тяжелой цепи (сокращаемый как VH) и константный участок тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи включает три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь включает переменный участок легкой цепи (сокращаемый как VL) и константный участок легкой цепи. Константный участок легкой цепи включает один домен (CL). VH и VL участки могут дополнительно подразделяться на участки гипервариабельности, называемые гипервариабельными участками (CDR), которые перемежаются с участками, которые являются более постоянными, называемыми каркасными областями (FR).

Как применяют в данной заявке, термин "N-связанный гликан" относится к N-связанному гликану, прикрепленному к азоту (N) боковой цепи аспарагина в сиквоне (т.е., Asn-X-Ser или Asn-X-Thr последо-

вательность, где X представляет собой любую аминокислоту за исключением пролина), имеющемуся в CH₂ домене Fc-участка. Такие N-гликаны подробно описаны, например, у Drickamer K, Taylor ME (2006) в *Introduction to Glycobiology*, 2nd ed., включенном в данную заявку во всей полноте посредством ссылки.

Как применяют в данной заявке, термин "афукозилированный" относится к N-связанному гликану, которому не хватает центральной молекулы фукозы, как описано в US8067232, содержание которого включено в данную заявку во всей полноте посредством ссылки.

Как применяют в данной заявке, термин "N-ацетил-D-глюкозамин в точках ветвления" относится к N-связанному гликану, имеющему молекулу N-ацетилглюкозамина (GlcNAc), связанную с центральной молекулой маннозы, как описано в US8021856, содержание которого включено в данную заявку во всей полноте посредством ссылки.

Как применяют в данной заявке, термин "заболевание, опосредованное антителами" относится к любому заболеванию или нарушению, вызванному или усиленному наличием у субъекта антител.

Как применяют в данной заявке, термин "Fc-содержащее средство" представляет собой любую молекулу, которая включает Fc-участок.

Как применяют в данной заявке, термин "средство, истощающее лейкоциты" относится к средству, которое уменьшает количество лейкоцитов у субъекта после его введения.

Как применяют в данной заявке, термин "средство, истощающее В-клетки" относится к средству, которое уменьшает количество В-клеток у субъекта после его введения.

Как применяют в данной заявке, термин "средство, истощающее Т-клетки" относится к средству, которое уменьшает количество Т-клеток у субъекта после его введения.

Как применяют в данной заявке, термин "аутоиммунная каналопатия" относится к заболеваниям, вызываемым аутоантителами, действующими против субъединиц ионных каналов или против молекулы, которая регулирует функцию канала.

Как применяют в данной заявке, термины "лечить" и "лечение" относятся к терапевтическим или профилактическим мерам, описанным в данной заявке. Способы "лечения" включают введение субъекту антитела или его антиген-связывающего фрагмента настоящего изобретения, например, субъекту, имеющему ИЛ-6-опосредованное заболевание или нарушение (например, воспаление или рак) или предрасположенному к развитию такового заболевания или нарушения, с целью профилактики, излечения, замедления, уменьшения тяжести или облегчения одного или более симптомов заболевания или нарушения, а также субъекту, имеющему рецидивирующее заболевание или нарушение, с целью пролонгирования выживаемости субъекта по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии подобного лечения. Как применяют в данной заявке, термин "субъект" включает людей и нечеловекообразных животных.

Как применяют в данной заявке, термин "иммуноадгезин" относится к антителоподобной молекуле, которая включает функциональный домен связывающего протеина (например, рецептор, лиганд или молекулу клеточной адгезии) с Fc-участком.

II. Антагонисты FcRn.

В одном аспекте изобретение предоставляет новые композиции антагониста FcRn. В целом, данные композиции включают вариантный Fc-участок или его FcRn-связывающий фрагмент, который специфически связывается с FcRn с повышенной аффинностью и сниженной pH-зависимостью по сравнению с нативным Fc-участком. Данные антагонисты FcRn ингибируют связывание Fc-содержащих средств (например, антител и иммуноадгезинов) с FcRn *in vivo*, что приводит к повышенной частоте разрушения Fc-содержащих средств и, следовательно, к снижению концентрации данных средств в сыворотке крови.

Текущее описание впервые раскрывает тот факт, что выделенный вариантный Fc-участок (например, вариантный Fc-участок, включающий аминокислоты Y, T, E, K, F и Y в положениях 252, 254, 256, 433, 434 и 436 по системе EU, соответственно) является более эффективным антагонистом FcRn *in vivo* по сравнению с полноразмерным антителом, включающим такой же вариантный Fc-участок. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления композиции антагониста FcRn не являются полноразмерными антителами. В некоторых вариантах осуществления композиции антагониста FcRn не включают вариабельный домен антитела. В некоторых вариантах осуществления композиции антагониста FcRn не включают вариабельный домен или CH1 домен антитела. Тем не менее, в некоторых вариантах осуществления композиции антагониста FcRn могут включать вариантный Fc-участок, связанный с одним или более дополнительными связывающими доменами или фрагментами, включая вариабельные домены антитела.

Любой Fc-участок может быть модифицирован для образования вариантного Fc-участка для его использования в раскрытых в данной заявке композициях антагониста FcRn. В целом, Fc-участок или его FcRn-связывающий фрагмент получен из иммуноглобулина человека. Тем не менее, следует понимать, что Fc-участок может быть получен из иммуноглобулина любого другого вида млекопитающих, включая, например, семейство верблюдовых, грызунов (например, мышей, крыс, кроликов, морских свинок) или виды нечеловекообразных приматов (например, шимпанзе, макаки). Более того, Fc-участок или его часть могут быть получены из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, а также из любого изотипа иммуноглобулинов, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах

осуществления Fc-участок представляет собой Fc-участок IgG (например: участок IgG человека). В некоторых вариантах осуществления Fc-участок представляет собой Fc-участок IgG1 (например: участок IgG1 человека). В некоторых вариантах осуществления Fc-участок представляет собой химерный Fc-участок, включающий части нескольких различных Fc-участков. Подходящие примеры химерных Fc-участков изложены в US20110243966A1, который включен в данную заявку во всей полноте посредством ссылки. Множество нуклеотидных последовательностей гена Fc-участка (например, нуклеотидных последовательностей гена константного участка человека) доступны в форме общедоступных депозитов. Специалистам должно быть ясно, что объем данного изобретения включает аллели, варианты и мутации Fc-участков.

Fc-участок может быть дополнительно укорочен или удален изнутри для образования его минимального FcRn-связывающего фрагмента. Способность фрагмента Fc-участка связываться с FcRn можно определить при помощи любого принятого в данной области анализа связывания, например, ИФА.

Для увеличения технологичности производства раскрытых в данной заявке антагонистов FcRn предпочтительным является то, что составляющие Fc-участки не включают никакие недисульфидносвязанные остатки цистеина. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления Fc-участки не включают свободные остатки цистеина.

Любой вариантный Fc или его FcRn-связывающий фрагмент, который специфически связывается с FcRn с повышенной аффинностью и сниженной pH зависимостью по сравнению с нативным Fc-участком, можно применять в раскрытых в данной заявке композициях антагонистов FcRn. В некоторых вариантах осуществления вариантный Fc-участок включает модификации аминокислот, замещения, инсерции и/или делеции, которые обеспечивают желаемые характеристики. В некоторых вариантах осуществления вариантный Fc-участок или фрагмент включают аминокислоты Y, T, E, K, F и Y в положениях 252, 254, 256, 433, 434 и 436 по системе EU, соответственно. Неограничивающие примеры аминокислотных последовательностей, которые можно применять в вариантных Fc-участках, изложены в данной заявке в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность Fc-доменов вариантного Fc-участка включает аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность Fc-доменов вариантного Fc-участка состоит из аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 1, 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления антагонист FcRn состоит из вариантного Fc-участка, где аминокислотная последовательность Fc-доменов вариантного Fc-участка состоит из аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности неограничивающих примеров вариантных Fc-участков

SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
1	CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALKFHYTQKSLSLSPG
2	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMEALKFHYTQKSLSLSPGK
3	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMEALKFHYTQKSLSLSPG

Аминокислоты в положениях 252, 254, 256, 433 и 434 по системе EU подчеркнуты.

В некоторых вариантах осуществления вариантный Fc-участок изменяет (например, повышает или снижает) аффинность связывания с дополнительным Fc-рецептором. Вариантный Fc-участок может иметь измененную (например, повышенную или сниженную) аффинность связывания с одним или более Fc γ рецепторов, например, Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA (CD32), Fc γ RIIB (CD32), Fc γ RIIIA (CD16a), и Fc γ RIIIB (CD16b). Можно применять принятые в данной области способы модификации аффинности для дополнительного Fc-рецептора. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность вариантного Fc-участка модифицирована.

В некоторых вариантах осуществления вариантный Fc-участок включает неприродный аминокислотный остаток в одном или более положениях, выбираемых из группы, состоящей из 234, 235, 236, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 252, 254, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 332, 333 и 334, как перечислено в списке EU и изложено у Kabat. Опционально Fc-участок может включать неприродный аминокислотный остаток в дополнительном и/или альтернативном положениях, известных специалисту в данной области техники (см., например, US Pat. Nos. 5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; PCT Patent Publications WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752 и WO 05/040217, содержание которых включено в данную заявку во всей полноте посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления вариантный Fc-участок включает по меньшей мере один аминокислотный остаток неестественного происхождения, выбираемый из группы, состоящей из 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 236E, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241L, 241Y, 241E, 241R, 243V, 243L, 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247V, 247G, 252Y, 254T, 256E, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 269H, 269Y, 269F, 269R, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 296G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 313F, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, и 332A, как перечислено в списке EU и изложено у Kabat. Опционально Fc-участок может включать дополнительные и/или альтернативные неприродные аминокислотные остатки, известные специалисту в данной области техники (см., например, U.S. Pat. Nos. 5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; PCT Patent Publications WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752 и WO 05/040217, содержание которых включено в данную заявку во всей полноте посредством ссылки).

Другие известные варианты Fc, которые можно применять в антагонистах FcRn, раскрытых в данной заявке, включают без ограничений таковые, раскрытые у Ghetie с соавт., 1997 Nat. Biotech. 15:637-40; Duncan с соавт., 1988, Nature 332:563-564; Lund с соавт., 1991, J. Immunol., 147:2657-2662; Lund с соавт., 1992, Mol. Immunol., 29:53-59; Alegre с соавт., 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins с соавт., 1995, Proc Natl. Acad Sci USA, 92:11980-11984; Jefferis с соавт., 1995, Immunol Lett., 44:111-117; Lund с соавт., 1995, Faseb J., 9:115-119; Jefferis с соавт., 1996, Immunol Lett., 54:101-104; Lund с соавт., 1996, J. Immunol., 157:4963-4969; Armour с соавт., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie с соавт., 2000, J. Immunol., 164:4178-4184; Reddy с соавт., 2000, J. Immunol., 164:1925-1933; Xu с соавт., 2000, Cell Immunol., 200:16-26; Idusogie с соавт., 2001, J. Immunol., 166:2571-2575; Shields с соавт., 2001, J Biol. Chem., 276:6591-6604; Jefferis с соавт., 2002, Immunol Lett., 82:57-65; Presta с соавт., 2002, Biochem Soc Trans., 30:487-490; U.S. Pat. Nos. 5,624,821; 5,885,573; 5,677,425; 6,165,745; 6,277,375; 5,869,046; 6,121,022; 5,624,821; 5,648,260; 6,528,624; 6,194,551; 6,737,056; 6,821,505; 6,277,375; U.S. Patent Publication Nos. 2004/0002587 и PCT Publications WO 94/29351; WO 99/58572; WO 00/42072; WO 02/060919; WO 04/029207; WO 04/099249; WO 04/063351, содержание которых включено в данную заявку во всей полноте посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления вариантный Fc-участок представляет собой гетеродимер, где составляющие Fc-домены отличаются друг от друга. Способы получения Fc-гетеродимеров известны в области техники (см., например, US 8216805, который включен в данную заявку во всей полноте посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления вариантный Fc-участок представляет собой одноцепочечный Fc-участок, где составляющие Fc-домены связаны друг с другом связывающим фрагментом. Способы получения одноцепочечных Fc-участков известны в области техники (см, например, US20090252729A1 и US20110081345A1, которые включены в данную заявку во всей полноте посредством ссылки).

Считается, что патогенетически значимые IgG антитела, наблюдаемые при аутоиммунных заболеваниях являются и патогенетическими триггерами для развития данных заболеваний, и вносят вклад в прогрессирование заболевания и обуславливают развитие заболевания благодаря неподходящей активации клеточных Fc-рецепторов. Агрегированные антитела и/или аутоантитела в комплексе с аутоантигенами (иммунные комплексы), связываются с активирующими Fc-рецепторами, вызывая множество аутоиммунных заболеваний (которые развиваются отчасти из-за иммунологически обусловленного воспаления против аутоклеток) (см, например, Clarkson с соавт., NEJM 314(9), 1236-1239 (2013)); US20040010124A1; US20040047862A1; и US2004/0265321A1, каждый из которых включен в данную заявку во всей полноте посредством ссылки. Соответственно, для лечения обусловленных антителами нарушений например, аутоиммунных заболеваний) будет иметь преимущество как удаление вредных антител, так и блокировка взаимодействия иммунных комплексов данных антител с активирующими Fc-рецепторами (например, Fcγ рецепторами, такими, как CD16a).

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления вариантный Fc-участок антагониста FcRn

ингибирует повышенное связывание с CD16a (например, CD16a человека). Это в частности имеет преимущество в отношении того, что позволяет антагонисту FcRn дополнительно антагонизировать опосредованный иммунными комплексами воспалительный ответ антител, выступающих мишенью для удаления путем ингибирования FcRn. Можно применять любые принятые в данной области способы повышения аффинности к CD16a (например, CD16a человека). В некоторых вариантах осуществления антагонист FcRn включает вариантный Fc-участок, включающий N-связанный гликан (например, в положении 297 по системе EU). В данном случае возможно повышение аффинности связывания антагониста FcRn к CD16a путем модификации структуры гликана. Модификации N-связанного гликана Fc-участков хорошо известны в области техники. Например, афукозилированные N-связанные гликаны или гликаны, имеющие структуру с N-ацетил-D-глюкозамином в точках ветвления, демонстрируют повышенную аффинность к CD16a. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления N-связанный гликан является афукозилированным. Афукозилирование может быть достигнуто любыми принятыми в данной области способами. Например, антагонист FcRn может быть экспрессирован на клетках, у которых отсутствует фукозилтрансфераза, так, что фукоза не добавляется к N-связанному гликану в положение 297 по системе EU вариантного Fc-участка (см., например, US 8,067,232, содержание которого включено в данную заявку во всей полноте посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления N-связанный гликан имеет структуру с N-ацетил-D-глюкозамином в точках ветвления. Структуру с N-ацетил-D-глюкозамином в точках ветвления можно получить при помощи любых принятых в данной области способов. Например, антагонист FcRn может быть экспрессирован на клетках, экспрессирующих бета-1-4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III (GnTIII), так, что N-ацетил-D-глюкозамин в точках ветвления добавляется к N-связанному гликану в положении 297 по системе EU вариантного Fc-участка (см., например, US 8,021,856, содержание которого включено в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки). Дополнительно или в качестве альтернативы модификация структуры N-связанного гликана также может быть достигнута ферментными средствами *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления текущее раскрытие предоставляет композиции антагониста FcRn, где часть молекул антагониста FcRn, содержащихся в ней, включают модифицированные структуры гликана. В некоторых вариантах осуществления композиция антагониста FcRn включает множество молекул антагониста FcRn, раскрытого в данной заявке, где по меньшей мере 50% (опционально по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 95 или 99%) молекул включают Fc-участок или его FcRn-связывающий фрагмент, имеющий в составе афукозилированный N-связанный гликан. В некоторых вариантах осуществления композиция антагониста FcRn, включает множество молекул антагониста FcRn, раскрытого в данной заявке, где по меньшей мере 50% (опционально по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 95 или 99%) молекул включают Fc-участок или его FcRn-связывающий фрагмент, включающий N-связанный гликан, имеющий N-ацетил-D-глюкозамин в точках ветвления.

В некоторых вариантах осуществления вариантный Fc-участок не включает N-связанный гликан. Этого можно достичь, применяя любые принятые в данной области способы. Например, вариантный Fc может быть экспрессирован в клетке, не способной к N-связанному гликозилированию. Дополнительно или в качестве альтернативы аминокислотная последовательность вариантного Fc может быть модифицирована для профилактики или ингибирования N-связанного гликозилирования (например, путем мутации в NXT сиквонсе. В качестве альтернативы вариантный Fc может быть синтезирован в бесклеточной системе (например, химически синтезирован).

В некоторых вариантах осуществления молекулы антагониста FcRn могут быть модифицированы, например, путем ковалентного присоединения молекулы (например, связывающего или радиофармацевтического фрагмента) к антагонисту FcRn так, что ковалентное присоединение не предотвращает специфическое связывание антагониста FcRn с FcRn. Например, без ограничений, антагонист FcRn может быть модифицирован при помощи гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации при помощи известных защищающих блокирующих групп, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком и т.д.

В некоторых вариантах осуществления антагонист FcRn включает вариантный Fc-участок, связанный с удлинителем периода полувыведения. Как применяют в данной заявке, термин "удлинитель периода полувыведения" относится к любой молекуле, которая при связи с антагонистом FcRn, раскрытым в данной заявке, повышает период полувыведения антагониста FcRn. Любой удлинитель периода полувыведения может быть связан (как ковалентно, так и нековалентно) с антагонистом FcRn. В некоторых вариантах осуществления удлинитель периода полувыведения представляет собой полиэтиленгликоль или сывороточный альбумин человека. В некоторых вариантах осуществления антагонист FcRn связан со связывающей молекулой, которая специфически связывается с удлинителем периода полувыведения, присутствующем у субъекта, такой, как переносимая с током крови молекула, или клетка, такая как сывороточный альбумин (например, сывороточный альбумин человека), IgG, эритроциты и т.д.

Антагонисты FcRn, раскрытые в данной заявке, обладают превосходной технологичностью производства. Например, как показано в примере 5 в данной заявке, они могут быть экспрессированы в высоких концентрациях в клетках млекопитающих (например, в концентрации 6 г/л в клетках ЯКХ в биореакторе с механическим перемешиванием объемом 10 л). Более того, после очищения Белка А конечная

очищенная композиция антагониста FcRn имеет очень высокое содержание мономеров антагонистов FcRn и содержит чрезвычайно небольшую концентрацию белковых агрегатов и продуктов распада антагониста FcRn. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие предоставляет композицию антагониста FcRn, включающую множество молекул антагониста FcRn, как раскрыто в данной заявке, где более 95% молекул антагонистов FcRn в композиции представляют собой момеры (например, более 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 00,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9%). В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие предоставляет композицию антагониста FcRn, включающую множество молекул антагониста FcRn, раскрытого в данной заявке, где менее 5% молекул антагониста FcRn в композиции присутствует в виде агрегатов (например, менее 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1%). В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие предоставляет композицию антагониста FcRn, включающую множество молекул антагониста FcRn, раскрытого в данной заявке, где композиция практически не содержит продукты распада молекулы антагониста FcRn.

III. Применения антагонистов FcRn.

Композиции антагонистов FcRn в настоящем раскрытии являются в частности полезными для снижения концентрации Fc-содержащих средств в сыворотке крови (например, антител и иммуноадгезинов). Соответственно, в одном аспекте текущее раскрытие предоставляет способ ингибирования функции FcRn у субъекта, где способ в целом включает введение субъекту эффективного количества композиции антагониста FcRn (например, фармацевтической композиции), раскрытого в данной заявке.

Снижение концентраций Fc-содержащих средств в сыворотке крови (например, антител и иммуноадгезинов) в частности применяют для лечения нарушений, опосредованных антителами (например, аутоиммунных заболеваний). Соответственно, в одном аспекте текущее раскрытие предоставляет способы лечения нарушений, опосредованных антителами (например, аутоиммунных заболеваний), при помощи раскрытых в данной заявке композиций антагониста FcRn.

Любое заболевание, опосредованное антителами, можно лечить при помощи раскрытых в данной заявке композиций антагониста FcRn. В некоторых вариантах осуществления нарушение, опосредованное антителами, представляет собой одно из тех, которые чувствительны к лечению ВВИГ. В некоторых вариантах осуществления заболевание, опосредованное антителами, представляет собой аутоиммунное заболевание. Неограничивающие аутоиммунные заболевания включают отторжение аллогенного островкового трансплантата, очаговую алопецию, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром, аутоиммунную Аддисонову болезнь, болезнь Альцгеймера, антинейтрофильные цитоплазматические антитела (ANCA), аутоиммунные заболевания надпочечников, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный миокардит, аутоиммунную нейтропению, аутоиммунный оофорит или орхит, аутоиммунную тромбоцитопению, аутоиммунную крапивницу, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, кардиомиопатию, болезнь Кастлемана, дерматит спруцелиакии, синдром хронической усталости и иммунной дисфункции, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (CIDP), синдром Черджа-Стросс, рубцовый пемфигоид, синдром Тибержа-Вайсенбаха, болезнь холодовых агглютининов, болезнь Крона, дерматомиозит, дилатационную кардиомиопатию, дискоидную волчанку, приобретенный буллезный эпидермолиз, идиопатическую криоглобулинемию смешанного типа, недостаточность фактора VIII, фибромиалгию-фибромиозит, гломерулонефрит, диффузный токсический зоб, синдром Гийена-Барре, синдром Гудпасчера, болезнь трансплантат против хозяина (GVHD, БТПХ), тиреоидит Хашимото, гемофилия А, идиопатическую мембранозную нейропатию, идиопатический легочный фиброз, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТР, ИТП), IgA нейропатию, IgM полинейропатию, иммуно-опосредованную тромбоцитопению, ювенильный артрит, синдром Кавасаки, плоский лишай, склерозирующий лишай, красную волчанку, болезнь Менъера, смешанную болезнь соединительной ткани, пемфигоид слизистых оболочек, рассеянный склероз, сахарный диабет I типа, мультифокальную моторную нейропатию (MMN), миастению gravis, паранеопластический буллезный пемфигоид, пемфигоид беременных, вульгарный пемфигоид, эксфолиативный пемфигоид, пернициозную анемию, нодозный полиартериит, полихондрию, полигландулярный синдром, ревматическую полимиалгию, полимиозит и дерматомиозит, первичную агаммаглобулинемию, первичный билиарный цирроз, псориаз, псориатический артрит, рецидивирующий полихондрит, феномен Рейно, синдром Рейтера, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермию, синдром Шегрена, реакцию отторжения солидного органа, синдром мышечной скованности, системную красную волчанку, синдром Такаясус, токсический эпидермальный некролиз (TEN, ТЭН), синдром Стивенса-Джонсона (SJS), височный артериит/гигантоклеточный артериит, тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру, язвенный колит, увеит, герпетиформный дерматит, васкулит, ассоциированный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами, витилиго и гранулематоз Вегенера.

В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой аутоиммунную каналопатию. Неограничивающие каналопатии включают нейромиелит зрительного нерва, миастенический синдром Ламберта-Итона, миастению gravis, энцефалит с антителами к N-метил-D-аспарататным (NMDA) рецепторам, энцефалит с антителами к рецепторам α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA), синдром Морвана и болезни глициновых рецепторов, ассоциированной с антителами.

Композиции антагонистов FcRn текущего раскрытия в частности подходят для лечения заболеваний, опосредованных антителами, характеризующихся избыточной выработкой сывороточного иммуноглобулина. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления композиции антагониста FcRn применяют для лечения гипергаммаглобулинемии.

Композиции антагониста FcRn также можно применять в комбинации с одним или более дополнительных лекарственных средств. В некоторых вариантах осуществления дополнительное лекарственное средство представляет собой противовоспалительное средство. Любое противовоспалительное средство можно применять в комбинации с раскрытыми в данной заявке композициями. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство представляет собой ритуксимаб, даклизумаб, базиликсимаб, мумомонаб-cd3, инфликсимаб, адалимумаб, омализумаб, эфализумаб, натализумаб, тоцилизумаб, экулизумаб, голимумаб, канакинумаб, устекинумаб или белимумаб. В некоторых вариантах осуществления дополнительное лекарственное средство представляет собой средство, истощающее лейкоциты (например, средство, истощающее В-клетки или Т-клетки). Любое средство, истощающее лейкоциты, можно применять в комбинации с композициями антагониста FcRn, раскрытыми в данной заявке. В некоторых вариантах осуществления средство, истощающее лейкоциты, представляет собой средство, истощающее В-клетки. В некоторых вариантах осуществления средство, истощающее лейкоциты, представляет собой антитело против маркера клеточной поверхности. Подходящие маркеры клеточной поверхности включают, без ограничений, CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD70, CD72, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85 или CD86. Антагонист FcRn и дополнительное(ые) лекарственное(ые) средство(а) можно вводить субъекту одновременно или последовательно одним(и) и тем(и) же путем (путями) введения.

Композиции антагониста FcRn текущего раскрытия также хорошо подходят для снижения концентрации средства, содержащего Fc в сыворотке крови субъекта. Такое быстрое очищение является выгодным в случаях, когда средство, содержащее Fc, является токсичным (например, конъюгатом антитела с лекарственным препаратом или средством, которое является иммуногенным), поскольку оно снижает экспозицию субъекта по отношению к лекарственному средству. Быстрое очищение также является выгодным в случаях, когда средство, содержащее Fc, представляет собой радиофармацевтическое средство, которое требует низкой концентрации средства для облегчения визуализации.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления композиции антагониста FcRn применяют для снижения концентрации средства, содержащего Fc, в сыворотке крови у субъекта, которому вводят средство, содержащее Fc. Концентрации средства, содержащего Ac, в сыворотке крови (например, лекарственного или диагностического средства), можно снизить, применяя композиции антагониста Ac, раскрытые в настоящей заявке. Неограничивающие примеры средств, содержащих Ac, включают радиофармацевтические средства (например, меченые антитела), конъюгаты антитела с лекарственным средством или иммуногенные средства (например, нечеловеческие антитела или иммуноадгезины). Антагонист FcRn можно вводить одновременно со средством, содержащим Fc, или последовательно (например, перед введением средства, содержащего Fc, или после него).

Более того, при заболеваниях или состояниях, требующих введения лекарственного средства, у пациента часто вырабатываются антитела (например, противолекарственные антитела) к лекарственному средству, которые в свою очередь мешают доступности лекарственного средства в отношении его лекарственных целей или вызывая развитие нежелательных реакций у субъекта. Соответственно, композиции антагониста FcRn, раскрытые в данной заявке, также можно применять для удаления антител (например, противолекарственных антител) к лекарственному средству, которые вырабатываются у субъекта.

Композиции антагониста FcRn, раскрытые в данной заявке, также можно применять в комбинации с лечебным белком для усиления пользы лечебного белка благодаря снижению концентраций IgG, где антитела IgG отвечают за снижение биодоступности лечебного белка. В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие предоставляет способ лечения заболевания, развивающегося в результате иммунного ответа в отношении фактора свертывания, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества композиций антагониста FcRn, раскрытых в данной заявке. Подходящие факторы свертывания включают без ограничений фибриноген, протромбин, фактор V, фактор VII, фактор VIII, фактор IX, фактор X, фактор XI, фактор XII, фактор XIII или фактор Виллебранда. Данный способ можно применять для регулирования или лечения, а также для профилактики иммунного ответа в отношении фактора свертывания у пациента, страдающего, например, от гемофилии А или гемофилии В. В некоторых вариантах осуществления способа можно применять для регулирования или лечения иммунного ответа в отношении, например, лечебного эритропоэтина у пациента, страдающего истинной эритроцитарной аплазией (ИЭЦА).

FcRn отвечает за транспортировку материнских антител через плаценту к плоду у беременных женщин. Соответственно, если беременная женщина принимает средство, содержащее Fc (например, лекарственный препарат на основе моноклональных антител), средство может контактировать с плодом в результате его переноса через плаценту, регулируемого FcRn. Для избежания любого вредного влияния средства, содержащего Fc, на развитие плода будет выгодным блокировать функцию FcRn. Соответственно, текущее раскрытие предоставляет способ профилактики чресплацентарного переноса средства,

содержащего Fc (например, лекарственного препарата на основе моноклональных антител), к плоду беременной женщины, где способ включает введение женщине композиции антагониста FcRn, раскрытой в данной заявке, как одновременно со средством, содержащим Fc, так и последовательно (до или после его введения).

Композиции антагониста FcRn, раскрытые в данной заявке, также можно применять для лечения воспалительных заболеваний, включающих, но не ограничивающихся астмой, язвенным колитом и синдромом раздраженного кишечника, аллергическими реакциями, включая аллергический ринит/синусит, кожными аллергическими реакциями (крапивницей/сыпью, ангионевротическим отеком, атопическим дерматитом), аллергической реакцией на пищевые продукты, аллергической реакцией на лекарственные средства, аллергическими реакциями на насекомых, мастоцитозом, артритом, включая остеоартрит, ревматоидным артритом и спондилоартропатией.

Успешное применение генотерапии для лечения заболевания или состояния может быть приостановлено выработкой антител, специфических к лечебному белку, кодируемому трансгеном, а также к вектору, применяемому для доставки трансгена. Соответственно композиции антагониста FcRn, раскрытые здесь, можно вводить в сочетании с генотерапией для усиления выгоды закодированного лечебного белка путем снижения концентраций IgG. Данные способы являются в частности полезными в ситуациях, когда антитела IgG несут ответственность за сниженную биодоступность генотерапевтического вектора или закодированного лечебного белка. Генотерапевтический вектор может представлять собой, например, вирусный вектор, например, вектор аденовируса и аденоассетеллитного вируса. Заболевания, которые можно лечить при помощи генотерапии, включают, но не ограничиваются муковисцидозом, гемофилией, ИЭЦА, мышечной дистрофией или лизосомальными болезнями накопления, такими, как болезнь Гоше и болезнь Фабри.

Специалист в данной области техники сможет при помощи стандартных исследований определить эффективное нетоксическое количество композиции антагониста FcRn для лечения заболеваний, опосредованных антителами. Например, терапевтически эффективное количество полипептида может варьироваться в соответствии с такими факторами, как стадия заболевания (например, на I стадии по сравнению с IV стадией), возраст, пол, медицинские осложнения (например, иммунодефицитные состояния или заболевания), а также вес субъекта и способность антитела вызывать желаемый ответ у субъекта. Например, несколько разделенных доз можно вводит ежедневно, или дозу можно пропорционально снижать, как показано при наличии необходимости в текущей ситуации. В целом, тем не менее, ожидают, что эффективная доза находится в диапазоне от приблизительно 0,1 до 10000 мг/кг веса тела в сутки, например, от приблизительно 1 до 1000, от приблизительно 10 до 500 или от приблизительно 50 до 250 мг/кг веса тела в сутки (например, приблизительно 70 мг/кг веса тела в сутки).

IV. Фармацевтические композиции

В другом аспекте текущее раскрытие предоставляет фармацевтические композиции, включающие антагонист FcRn или композицию антагониста FcRn, раскрытую в данной заявке, а также фармацевтические приемлемый носитель или эксципиент. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, написанной E.W. Martin. Примеры эксципиентов могут включать крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, карбонат кальция, силикагель, стеарат натрия, глицеринмоностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое снятое молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Композиция также может содержать реагенты, буферирующие pH, а также смачивающие или эмульгирующие средства.

Фармацевтические композиции можно разрабатывать для парентерального введения (например, для внутривенного или внутримышечного введения) при помощи болюсной инъекции. Составы для инъекции могут быть представлены в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах или многодозовых контейнерах с добавлением консерванта. Композиции могут находиться в форме суспензий, растворов или эмульсий в масляных или водных растворителях, а также могут содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства. В качестве альтернативы активный ингредиент может находиться в форме порошка для разбавления подходящим растворителем, например, апиогенной водой.

Антагонисты FcRn могут быть связаны с хелаторами, такими, как те, которые описаны в U.S. Pat. №5,326,856. Комплекс пептид-хелатор может быть далее помечен радиоактивным изотопом для предоставления радиофармацевтического средства для диагностики или лечения заболеваний или состояний, включающих регулирование концентраций IgG.

V. Изготовление антагонистов FcRn

В одном аспекте изобретение предоставляет полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева, кодирующие антагонисты FcRn, раскрытые в данной заявке. Также предоставлены способы получения антагонистов FcRn, включающие экспрессирование данных полинуклеотидов.

Полинуклеотиды, кодирующие антагонисты FcRn, раскрытые в данной заявке, обычно вставляются в экспрессионный вектор для введения в клетки-хозяева, которые можно применять для изготовления желаемого количества заявленных антагонистов FcRn. Соответственно, в некоторых аспектах, изобретение предоставляет экспрессионные векторы, включающие полинуклеотиды, раскрытые в данной заявке,

и клетки-хозяева, включающие данные векторы и полинуклеотиды.

Термин "вектор" или "экспрессионный вектор" применяют в данной заявке с целью описания и заявления, для обозначения векторов, применяемых в соответствии с настоящим изобретением в качестве носителя для введения и экспрессирования желаемого гена в клетке. Как известно специалистам в данной области техники, такие векторы можно легко выбирать из группы, состоящей из плазмид, фагов, вирусов и ретровирусов. В целом, векторы, совместимые с текущим изобретением, будут включать селективный маркер, подходящие сайты рестрикции для облегчения клонирования желаемого гена и возможности проникновения и/или репликации в эукариотических или прокариотических клетках.

Для целей данного изобретения можно применять множество различных систем экспрессионных векторов. Например, вектор одного класса использует элементы ДНК, которые получены из животных вирусов, таких, как вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус полиомы, аденовирус, вирус осповакцины, бакуловирус, ретровирусы (респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), вирус опухоли молочной железы мышей (MMTV), вирус мышинного лейкоза Молони (MOMLV)) или вакуолизирующий обезьяний вирус (SV40). Другие включают применение полицистронных систем с внутренними сайтами связывания рибосом. В дополнение, клетки со встроенными в их хромосомы ДНК, можно выбирать путем введения одного или нескольких маркеров, которые обеспечивают селекцию трансфектированных клеток-хозяев. Маркер может обеспечить прототропность к ауксотрофному хозяину, резистентность к биоцидам (например, к антибиотикам) или резистентность к тяжелым металлам, таким, как медь. Селектируемый маркер гена может быть как напрямую связан с ДНК-последовательностью для экспрессирования, так и введен в ту же клетку путем котрансформации. Для оптимального синтеза мРНК также необходимы дополнительные элементы. Эти элементы могут включать сигнальные последовательности, сигналы сплайсинга, а также промотеры транскрипции, сигналы усиления и терминальные сигналы.

В более общем смысле после подготовки вектора или ДНК-последовательности, кодирующей антагонист FcRn, экспрессионный вектор можно вводить в подходящую клетку-хозяин. Таким образом происходит трансформация клетки-хозяина. Введение плазмиды в клетку-хозяин можно выполнить при помощи различных техник, хорошо известных специалисту в данной области техники. Они включают, но не ограничиваются трансфекцией (включая электрофорез и электропорацию), слиянием протопластов, осаждением фосфата кальция, слиянием клеток с ДНК в оболочке, микроинъекцией и инфицированием интактным вирусом. См. Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). Более предпочтительным является введение плазмиды в клетку-хозяин при помощи электропорации. Трансформированные клетки растут в условиях, подходящих для производства антагонистов FcRn, и оцениваются на предмет экспрессии антагониста FcRn. Типичные методы анализа включают иммуоферментный твердофазный анализ (ИФА), радиоиммунологический анализ (РИА) или анализ с помощью клеточного сортера с активацией флуоресценции (FACS), иммуногистохимию и т.п.

Как применяют в данной заявке, термин "трансформация" используют в широком смысле для обозначения введения ДНК в клетку-хозяин, являющуюся реципиентом, для изменения генотипа, что, следовательно, приводит к изменениям в клетке-реципиенте.

В тех же строчках "клетки-хозяева" обозначают клетки, которые были трансформированы при помощи векторов, созданных с применением технологий рекомбинантных ДНК, и кодирующих по меньшей мере один гетерологичный ген. В описаниях процессов выделения полипептидов из рекомбинантных хозяев термины "клетка" и "культура клеток" являются взаимозаменяемыми и обозначают источник антагониста FcRn, если не указано иное. Другими словами, восстановление антагониста FcRn из "клеток" может означать как его получение из центрифугированных цельных клеток, так и из культуры клеток, содержащей как среду, так и суспендированные клетки.

В одном варианте осуществления линия клеток-хозяев, применяемая для экспрессирования антагониста FcRn, имеет происхождение от млекопитающих; специалисты в данной области техники могут определить конкретные линии клеток-хозяев, которые подходят для экспрессирования на них желаемого генного продукта. Типичные линии клеток-хозяев включают, но не ограничиваются DG44 и DUXB11 (линии клеток яичника китайского хомячка, DHFR минус), HELA (карцинома шейки матки человека), CV1 (линия клеток почки обезьяны), COS (производное CV1 с SV40 Т антигеном), R1610 (фибробласты китайского хомячка) BALBC/3T3 (фибробласты мышей), HAK (линия клеток почки хомячка), SP2/O (миелома мышей), BFA-1c1BPT (эндотелиальные клетки крупного рогатого скота), RAJI (лимфоциты человека), 293 (почка человека). В одном варианте осуществления линия клеток обеспечивает модифицированное гликозилирование, например, афукозилирование экспрессированного на ней антагониста FcRn (например, PER.C6.RTM. (Crucell) или FUTS-нокаутированные CHO линии клеток (Potelligent™ Cells) (Biowa, Princeton, N.J.)). В одном варианте осуществления можно применять NS0 клетки. CHO клетки являются в частности предпочтительными. Линии клеток-хозяев обычно доступны в коммерческой среде, в Американской Коллекции Тканевых Культур или в опубликованных данных литературы.

Изготовление *in vitro* позволяет увеличить мощность для получения большего количества желаемого антагониста FcRn. Техники культивирования клеток млекопитающих в условиях выращивания тканевых культур известны в данной области техники и включают гомогенную суспензионную культуру, на-

пример, в аэролизном реакторе или в проточном реакторе смешения, или неподвижную или инкапсулированную клеточную культуру, например, в полых волокнах, микрокапсулах, на агарозных микрочастичах или пьезоэлектрических головках. При необходимости и/или желании растворы полипептидов можно очистить при помощи обычных хроматографических способов, например, гель-фильтрации, ионообменной хроматографии, хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе и/или (иммуно-) аффинной хроматографии.

Гены, кодирующие антагонисты FcRn изобретения, также могут быть экспрессированы на клетках не млекопитающих, таких, как клетки бактерий или дрожжей, а также клетки растений. Поэтому следует иметь в виду, что различные одноклеточные микроорганизмы, не относящиеся к млекопитающим, такие, как бактерии, также могут быть модифицированы; т.е., речь идет о тех из них, которые способны расти в культурах клеток или в процессе ферментации. Бактерии, чувствительные к модификации, включают члены семейства *Enterobacteriaceae*, такие, как штаммы *Escherichia coli* или *Salmonella*; *Bacillaceae*, такие, как *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* и *Haemophilus influenzae*. Также следует помнить, что при экспрессировании на бактериях антагонисты FcRn могут стать частью телец включения. Антагонисты FcRn должны быть выделены, очищены и далее объединены в функциональные молекулы. В дополнение к прокариотам можно использовать эукариотические микроорганизмы. Среди эукариотических микроорганизмов *Saccharomyces cerevisiae* или обычные хлебопекарские дрожжи применяются наиболее часто, хотя множество других штаммов находятся в широком доступе.

В дополнение к системе экспрессирования на клетках антагонисты FcRn также можно производить при помощи бесклеточных методов или методов химического синтеза. В некоторых вариантах осуществления антагонисты FcRn изготавливают *in vitro* путем химического синтеза.

IV. Иллюстративные примеры.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует считать дополнительно ограничивающими. Содержание Списка последовательностей, чертежей и все ссылки, патенты и опубликованные патентные заявки, цитируемые на протяжении данной заявки, явным образом включены в данную заявку посредством ссылки.

Пример 1. Влияние Fc-Abdeg на концентрации IgG в сыворотке крови у яванских макаков.

Определяют влияние антилизосомальных IgG человека (HEL-Abdeg) и Fc-участка IgG человека (Fc-Abdeg), включающего аминокислоты Y, T, E, K, F и Y в положениях 252, 254, 256, 433, 434 и 436, соответственно, по системе EU (Fc-Abdeg; SEQ ID NO: 2), на концентрации меченых антител IgG в сыворотке крови у яванских макаков. Конкретно яванским макакам вводят 1 мг/кг антимышиного CD70 hIgG1 меченого антитела (FR70-hIgG1; Oshima с соавт., *Int Immunol* 10(4): 517-26 (1998)) при помощи внутривенной (в/в) болюсной инъекции. Животным через 5 минут вводят при помощи инфузии либо 7 мг/кг Fc-Abdeg, либо 20 мг/кг HEL-Abdeg, либо фосфатно-солевой буфер (PBS) (2 обезьяны в каждой группе). Инфузию проводят в течение 1 часа и животным вводят объем, равный 10 мл/кг. Пробы крови (3×150 мкл) забирают за 5 мин до введения дозы ("до приема препарата") и через 5 мин, 2 ч, 6 ч, 24 ч, 48 ч, 72 часа, 96 ч и 120 ч после завершения инфузии. Концентрации меченых веществ определяют при помощи mCD-70-связывающего ИФА, и данные распределяют относительно концентраций меченых веществ в конце дозирования (фиг. 1). Также определяют общие концентрации IgG у яванских макаков (фиг. 2). Результаты данных экспериментов демонстрируют, что Fc-Abdeg снижает количество меченых антител более эффективно по сравнению с эквимоллярными количествами HEL-Abdeg.

В дополнение к его ключевой роли в "реутилизационном" пути IgG FcRn также участвует в гомеостазе альбуминов (Chauldhury с соавт., *J Exp Med.* 197(3):315-22 (2003)). FcRn взаимодействует с определенными сайтами IgG-Fc и альбумина, и связывание может происходить одновременно (Andersen с соавт., *Nat Commun.* 3:610 (2012)). В принципе, блокада утилизации IgG при помощи Abdeg-модифицированных молекул не должна вмешиваться во взаимодействие альбумин-FcRn. *In vivo* исследование на мышах, где авторы показали отсутствие влияния Abdeg-экипированной молекулы hIgG1 на концентрации альбуминов, подтверждает гипотезу (Patel с соавт., *J Immunol* 187(2): 1015-22 (2011)). В эксперименте, описанном выше, концентрации альбуминов также определяют на -3 день, 3 день и 17 день после завершения инфузии. Аналогично исследованию с участием мышей, никакие значимые изменения в концентрациях альбуминов не наблюдались после лечения Fc-Abdeg или HEL-Abdeg (см. фиг. 3).

В последующем эксперименте антитело-истощающую способность Fc-Abdeg сравнивают с ВВИГ. Конкретно, яванским макакам вводят 1 мг/кг меченого антитела (FR70-hIgG1) за 2 дня до дозирования 70 мг/кг Fc-Abdeg или 2 г/кг ВВИГ (2 обезьяны в каждой группе). Инфузию Fc-Abdeg и ВВИГ проводят в течение 4 ч, и животным вводят объем, равный 20 мл/кг. Пробы крови (3×150 мкл) забирают за 5 минут до введения дозы ("до приема препарата") и через 5 мин, 2 ч, 6 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 120 ч и 168 ч после завершения инфузии. Концентрации меченых веществ определяют при помощи mCD70-связывающего ИФА, и распределяют относительно концентраций "до приема препарата" (фиг. 4). По сравнению с лечением ВВИГ в клинической дозе (2 г/кг) 70 мг/кг Fc-Abdeg показывает значительно улучшенную кинетику клиренса меченого вещества и также большую способность к более эффективному очищению (>95% клиренса меченого вещества за 4 дня для Abdeg по сравнению с ~75% за 7 дней для ВВИГ).

Пример 2. Влияние афукозилирования на аффинность Fc-Abdeg по отношению к CD16a человека и CD16-2 мышей.

Аффинность связывания Fc-Abdeg в отношении hCD16a определяют и сравнивают с афукозилированной формой (Fc-Abdeg-POT). В тот же эксперимент включен вариант Fc-Abdeg, демонстрирующий улучшенную аффинность для всех FcγR ("Fc-Abdeg-S239D/I332E). Конкретно луночный планшет Maxisorp покрывают 100 нг/лунку Нейтравидин Биотин-связывающего Белка (ThermoScientific, 31000) и инкубируют в течение ночи при 4°C. На следующий день луночный планшет блокируют ФСБ+1% казеином в течение 2 ч при комнатной температуре. Далее 100 мкл/лунка раствора 250 нг/мл (разведение в ФСБ+0,1% казеине) биотинилированного hCD16a (Sino Biological Inc., 10389-H28H1-B) добавляют в луночный планшет и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре до применения градиента концентрации молекул Fc-Abdeg или Fc-Abdeg-POT (1 мкмоль-0,005 нмоль) в течение еще одного часа. Связывание с hCD16a определяют при помощи HRP-конъюгированного поликлонального античеловеческого козьего Fc-антитела (Jackson ImmunoResearch, 109-035-008) (инкубирование в течение 1 ч при КТ, разведение 1/50000 в ФСБ+0,1% казеине), после чего добавляют 100 мкл уравновешенного при комнатной температуре ТМБ (ТМБ) (SDT-реагенты #s ТМБ). Луночный планшет инкубируют в течение 10 минут до добавления 100 мкл 0,5 N H₂SO₄ и измеряют оптическую плотность OD450 нм (ОП450 нм). Величину EC₅₀ (эффективной концентрации, вызывающей 50% ингибирование вирусной репликации) определяют при помощи программного обеспечения GraphPad Prism. Результаты данных экспериментов, отображаемые на фиг. 5, демонстрируют тот факт, что дефукозилирование молекулы Fc-Abdeg приводит к повышению аффинности к hCD16a в >30 раз (EC₅₀=13 нмоль для Fc-Abdeg-POT по сравнению с EC₅₀>0,4 мкмоль для фукозилированного Fc-Abdeg). Как ожидалось, аффинность связывания вариантного Fc-Abdeg-S239D/I332E для hCD16a выше по сравнению с Fc-Abdeg дикого типа (EC₅₀=6 нмоль).

Используя схожую экспериментальную процедуру, как описано выше, определяют аффинность связывания для CD16-2 мышей (Sino Biological Inc., 50036-M27H-B). Результаты данных экспериментов, отображаемые на фиг. 6, снова демонстрируют повышенную аффинность афукозилированного варианта по сравнению с Fc-Abdeg дикого типа (EC₅₀=11 нмоль по сравнению с EC₅₀>100 нмоль). Степень повышения аффинности для mCD16-2 варианта Fc-Abdeg-POT по сравнению с Fc-Abdeg дикого типа ниже той, которая наблюдается для связывания с CD16a человека. Это влияние не наблюдается в отношении варианта Fc-Abdeg-S239D/I332E (EC₅₀=2 нмоль), для которого наблюдается сходная степень повышения аффинности по сравнению с Fc-Abdeg дикого типа как для CD16a человека, так и мыши (EC₅₀=2 нмоль).

Аутоантитела в комплексе с аутоантигенами связываются с активирующими FcγR и, таким образом, запускают аутоиммунные заболевания, которые развиваются отчасти из-за опосредованного иммунным воспалением, направленным на собственные ткани. Способность Fc-Abdeg антагонизировать взаимодействие аутоиммунных антител и FcγRIII-рецепторов на НК-клетках оценивают в двух анализах на основе АЗКЦ.

Изначально биотест по гену-репортеру на АЗКЦ (Promega, G7016) используют для анализа сравнительной hCD16a связывающей способности Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT и Fc-Abdeg-S239D/I332E. Конкретно 10000 клеток Raji, экспрессирующих CD20 (клетки-мишени), инкубируют с 60000 клеток Jurkat, экспрессирующих hCD16a (эффекторные клетки), в присутствии 100 нг/мл анти-CD20 антитела и растущей концентрации конкурирующего вещества. Клетки инкубируют в течение 6 часов при 37°C перед измерением биолюминесцирующего сигнала, который является мерой АЗКЦ активности. Сигнал от люциферазы определяют относительно сигнала, полученного 100 нг/мл анти-CD20 в отсутствие конкурирующего вещества (см. фиг. 7). Эти эксперименты демонстрируют тот факт, что как Fc-Abdeg-POT, так и Fc-Abdeg-S239D/I332E эффективно блокируют анти-CD20-индуцированный АЗКЦ сигнал, во время, как инкубирование Fc-Abdeg дикого типа не ведет к конкурентному связыванию hCD16a, экспрессированных на клетках Jurkat.

В следующем анализе АЗКЦ тестируют литическую активность анти-hCD70 антитела (27B3-hIgG1) Fc-Abdeg и Fc-Abdeg-POT в качестве меры конкурентного связывания hCD16. Конкретно, приблизительно 50000 hCD70-экспрессирующих клеток U266 вносят в приблизительно 300000 свежеочищенных мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК, PBMC) от здорового донора в присутствии 50 нг/мл анти-hCD70 антитела и градиента концентрации Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT и ВВИГ. Клетки U266 инкубируют в течение 2 дней с последующим анализом клеточного лизиса при помощи FACS с применением специфического для клеток U266 маркера (CD28). Результаты данных экспериментов, отображаемые на фиг. 8, демонстрируют тот факт, что анти-CD70 антителу эффективно лизирует клетки U266, и что это истощение можно ослабить в зависимости от дозы путем добавления Fc-Abdeg-POT, но не Fc-Abdeg дикого типа или ВВИГ. Эти данные демонстрируют, что Fc-Abdeg POT усиливает конкурентно связывающие CD16a свойства по сравнению с Fc-Abdeg дикого типа и ВВИГ.

Пример 3. Мышиная модель ОИТ (острой иммунной тромбоцитопении).

Терапевтическую эффективность молекул Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT, Fc-Abdeg-S239D/I332E тестируют на мышиной модели острой иммунной тромбоцитопении. Конкретно мышей C57BL/6 лечат ВВИГ (20 мг/животное), Fc-Abdeg (1 мг/животное), Fc-Abdeg-POT (1 мг/животное), Fc-Abdeg-S239D/I332E (1

мг/животное) или раствором хлорида натрия при помощи интраперитонеальной инфузии (5 животных в каждой группе). Перед лечением производят забор пробы крови для исходных измерений содержания тромбоцитов. Через час мыши получают 5 мкг/животное антимышиного тромбоцитарного антитела MWReg30 (Nieswandt с соавт., Blood 94:684-93 (1999)). Содержание тромбоцитов мониторируют в течение 24 ч. Содержание тромбоцитов нормализуют относительно исходного содержания для каждой мыши, и число тромбоцитов определяют при помощи проточной цитометрии с анти-CD61 окрашиванием. Результаты данных экспериментов, отображаемые на фиг. 9, демонстрируют, что предварительное лечение Fc-Abdeg снижает MWReg30-индуцированную тромбоцитопению со сходной эффективностью по сравнению с семикратно более высокой молярной дозой ВВИГ, и дополнительно, что блокада Fc γ R при помощи Fc-Abdeg POT и Fc-Abdeg-S239D/I332E оказывает синергическое положительное влияние в этой модели, что можно наблюдать по улучшенному содержанию тромбоцитов во временные точки 180 и 1440 мин.

Пример 4. Технологичность производства Fc-Abdeg Fc-Abdeg (включающий Fc-домены, имеющие SEQ ID NO: 2) получают в CHO клетках (Evitria, Switzerland) путем транзientной трансфекции. После трансфекции высокие титры Fc-Abdeg определяют в надосадочных жидкостях (между 2 00 и 400 мг/мл). Сходная предпочтительная структура изготовления наблюдается в случае, когда Fc-Abdeg экспрессируется из экспрессирующей конструкции, стабильно встроенной в линию клеток CHO GS-XCEED (Lonza, Great-Britain). В среднем, стабильные трансфектанты производят 3 г/л, и определяют несколько клонов, которые производят вплоть до 6 г/л Fc-Abdeg в биореакторе с механическим перемешиванием объемом 10 л.

Технологичность производства Fc-Abdeg дополнительно исследуют при помощи анализа агрегатов и продуктов распада после очищения белка-A вышеупомянутого массового производства Fc-Abdeg. Конкретно, 137 мкг Fc-Abdeg загружают в колонку для гель-фильтрации Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare), соединенную с хроматографической системой AktaPurifier. Результаты данного эксперимента, отображаемые на фиг. 10, демонстрируют тот факт, что наблюдается всего лишь очень небольшой процент Fc-Abdeg агрегатов (~0,5%), в то время, как определяются продукты распада Fc-Abdeg. Дополнительно применение различных стрессовых условий (заморозка-разморозка, ротационное напряжение или температурное напряжение) к очищенному с белком-A Fc-Abdeg не приводит к каким-либо явным изменениям физико-химических или функциональных свойств. Собранные вместе, эти данные демонстрируют превосходную технологичность производства Fc-Abdeg.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный антагонист FcRn, который состоит из вариантного Fc-участка IgG1, где Fc-домены Fc-участка содержат аминокислоты Y, T, E, K, F и Y в положениях 252, 254, 256, 433, 434 и 436 по системе EU, соответственно, и где Fc-участок связывается с FcRn с повышенной аффинностью и сниженной pH-зависимостью по сравнению с Fc-участком IgG1 дикого типа.

2. Антагонист FcRn по п.1, где Fc-участок имеет повышенную аффинность для Fc гамма-рецептора по сравнению с аффинностью Fc-участка IgG дикого типа в отношении Fc гамма-рецептора.

3. Выделенный антагонист FcRn, который состоит из вариантного Fc-участка IgG1, где аминокислотная последовательность Fc-доменов вариантного Fc-участка состоит из аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

4. Выделенный антагонист FcRn по п.3, где аминокислотная последовательность Fc-доменов вариантного Fc-участка состоит из аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 1.

5. Выделенный антагонист FcRn по п.3, где аминокислотная последовательность Fc-доменов вариантного Fc-участка состоит из аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 2.

6. Выделенный антагонист FcRn по п.3, где аминокислотная последовательность Fc-доменов вариантного Fc-участка состоит из аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 3.

7. Выделенный антагонист FcRn по любому из пп.1-6, где вариантный Fc-участок обладает повышенной аффинностью к CD16a.

8. Выделенный антагонист FcRn по любому из пп.1-7, где Fc-домены вариантного Fc-участка включают Fc-домен, имеющий афукозилированный N-связанный гликан в положении 297 по системе EU, или где Fc-домены вариантного Fc-участка включают N-связанный гликан, имеющий N-ацетил-D-глюкозамин в точках ветвления в положении 297 по системе EU Fc-доменов.

9. Выделенный антагонист FcRn по любому из предшествующих пунктов формулы изобретения, где вариантный Fc-участок связан с удлинителем периода полувыведения, или связан со связывающей молекулой, которая специфически связывается с удлинителем периода полувыведения, присутствующем у субъекта.

10. Выделенный антагонист FcRn по п.9, где удлинитель периода полувыведения представляет собой полиэтиленгликоль или сывороточный альбумин человека.

11. Выделенный антагонист FcRn по п.9, где удлинитель периода полувыведения является связывающей молекулой, которая специфически связывается с сывороточным альбумином человека.

12. Композиция антагониста FcRn, включающая множество молекул антагониста FcRn по п.9, где по меньшей мере 50% молекул включают вариантный Fc-участок, включающий афукозилированный N-связанный гликан, или где по меньшей мере 50% молекул включают вариантный Fc-участок, включающий N-связанный гликан, имеющий N-ацетил-D-глюкозамин в точках ветвления.

13. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания, опосредованного антителами, у субъекта, включающая антагониста FcRn по любому из предшествующих пунктов формулы изобретения, а также фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

14. Применение антагониста FcRn по любому из пп.1-12 для снижения концентраций Fc-содержащего средства в сыворотке крови субъекта, которому вводят Fc-содержащее средство, где указанный антагонист FcRn вводят одновременно или последовательно указанному субъекту.

15. Применение антагониста FcRn по п.14, где Fc-содержащее средство представляет собой антитело или иммуноадгезин, или где Fc-содержащее средство представляет собой лекарственное или диагностическое средство, или где Fc-содержащее средство представляет собой радиофармацевтическое средство, или где Fc-содержащее средство представляет собой конъюгат антитела с лекарственным средством.

16. Применение антагониста FcRn по любому из пп.1-12 для лечения заболеваний, опосредованных антителами, у субъекта.

17. Применение антагониста FcRn по п.16, где заболевание, опосредованное антителами, представляет собой аутоиммунное заболевание, где аутоиммунное заболевание выбирают из группы, состоящей из отторжения аллогенного островкового трансплантата, очаговой алопеции, анкилозирующего спондилита, антифосфолипидного синдрома, аутоиммунной Аддисоновой болезни, болезни Альцгеймера, антинейтрофильных цитоплазматических антител (ANCA), аутоиммунных заболеваний надпочечников, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного миокардита, аутоиммунной нейтропении, аутоиммунного оофорита или орхита, аутоиммунной тромбоцитопении, аутоиммунной крапивницы, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, кардиомиопатии, болезни Кастлемана, дерматита спруцелиакии, синдрома хронической усталости и иммунной дисфункции, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIDP), синдрома Черджа-Стросс, рубцового пемфигоида, синдрома Тибержа-Вайсенбаха, болезни холодных агглютининов, болезни Крона, дерматомиозита, дилатационной кардиомиопатии, дискоидной волчанки, приобретенного буллезного эпидермолиза, идиопатической криоглобулинемии смешанного типа, недостаточности фактора VIII, фибромиалгии-фибромиозита, гломерулонефрита, диффузного токсического зоба, синдрома Гийена-Барре, синдрома Гудпасчера, болезни трансплантат против хозяина (GVHD, БТПХ), тиреоидита Хашимото, гемофилии А, идиопатической мембранозной нейропатии, идиопатического легочного фиброза, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП, ИТП), IgA нейропатии, IgM полинейропатии, иммуно-опосредованной тромбоцитопении, ювенильного артрита, синдрома Кавасаки, плоского лишая, склерозирующего лишая, красной волчанки, болезни Менъера, смешанной болезни соединительной ткани, пемфигоида слизистых оболочек, рассеянного склероза, сахарного диабета I типа, мультифокальной моторной нейропатии (MMN), миастении gravis, паранеопластического буллезного пемфигоида, пемфигоида беременных, вульгарного пемфигоида, эксфолиативного пемфигоида, пернициозной анемии, нодозного полиартериита, полихондрии, полигландулярного синдрома, ревматической полимиалгии, полимиозита и дерматомиозита, первичной агаммаглобулинемии, первичного билиарного цирроза, псориаза, псориатического артрита, рецидивирующего полихондрита, феномена Рейно, синдрома Рейтера, ревматоидного артрита, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, реакции отторжения солидного органа, синдрома мышечной скованности, системной красной волчанки, синдрома Такаясу, токсического эпидермального некролиза (TEN, ТЭН), синдрома Стивенса-Джонсона (SJS), височного артериита/гигантоклеточного артериита, тромботической тромбоцитопенической пурпуры, язвенного колита, увеита, герпетического дерматита, васкулита, ассоциированный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами, витилиго и гранулематоза Вегенера.

18. Применение антагониста FcRn по п.16, где заболевание, опосредованное антителами, лечат при помощи внутривенного иммуноглобулина (ВВИГ), плазмафереза и/или иммуносорбции.

19. Применение антагониста FcRn по п.18, где аутоиммунное заболевание представляет собой аутоиммунную каналопатию, где каналопатию выбирают из группы, состоящей из аутоиммунного энцефалита с поражением лимбической системы, эпилепсии, нейромиелимита зрительного нерва, миастенического синдрома Ламберта-Итона, миастении gravis, энцефалита с антителами к N-метил-D-аспаратным (NMDA) рецепторам, энцефалита с антителами к рецепторам α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA), синдрома Морвана, нейромитонии, детских аутоиммунных психоневрологических заболеваний, ассоциированных со стрептококковой инфекцией (PANDAS) и болезни глициновых рецепторов, ассоциированной с антителами.

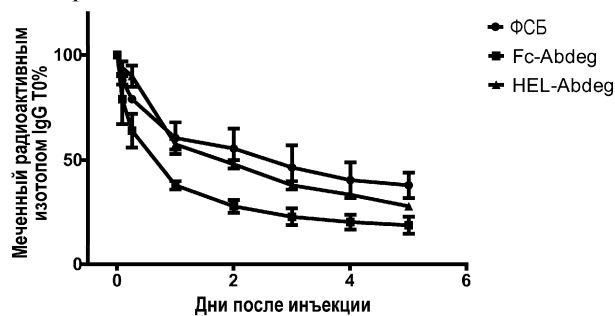
20. Применение антагониста FcRn по п.16, где нарушение, опосредованное антителами, представляет собой гиперглобулинемию.

21. Применение антагониста FcRn по п.16, где антагонист FcRn вводят субъекту одновременно с дополнительным лекарственным средством или последовательно, где дополнительное лекарственное

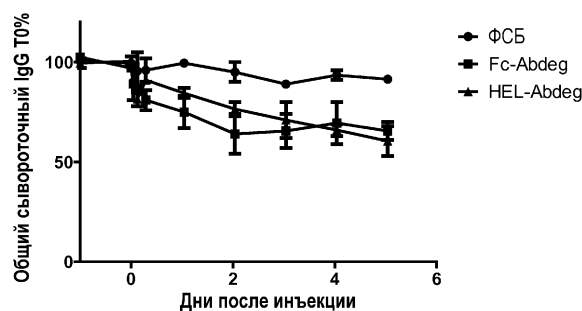
средство представляет собой противовоспалительное средство или средство, истощающее лейкоциты.

22. Применение антагониста FcRn по п.21, где средство, истощающее лейкоциты, представляет собой средство, истощающее В-клетки, антитело, где антитело специфически связывается с CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD70, CD72, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, или CD86.

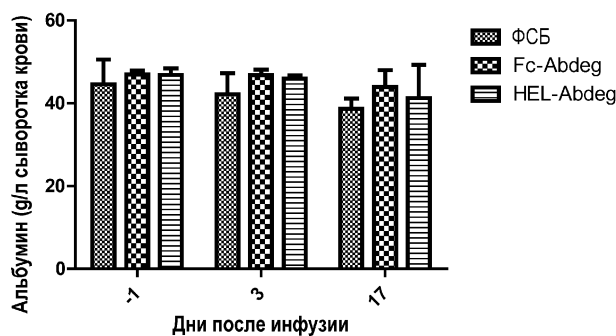
23. Применение антагониста FcRn по п.21, где дополнительное лекарственное средство представляет собой ритуксимаб, даклизумаб, базиликсимаб, муромонаб-сd3, инфликсимаб, адалимумаб, омализумаб, эфализумаб, натализумаб, тоцилизумаб, экулизумаб, голимумаб, канакинумаб, устекинумаб, бели-
мумаб или комбинации вышеперечисленных веществ.



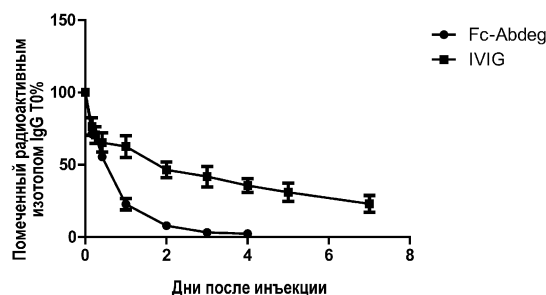
Фиг. 1



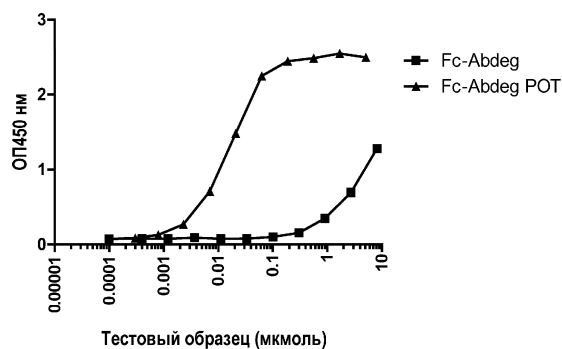
Фиг. 2



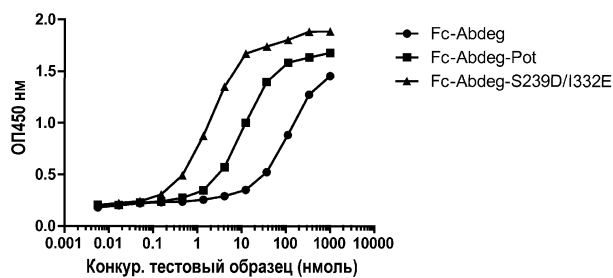
Фиг. 3



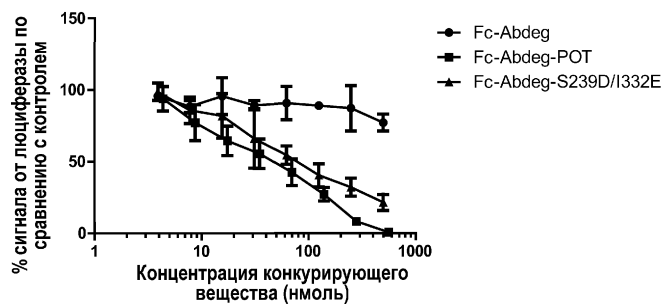
Фиг. 4



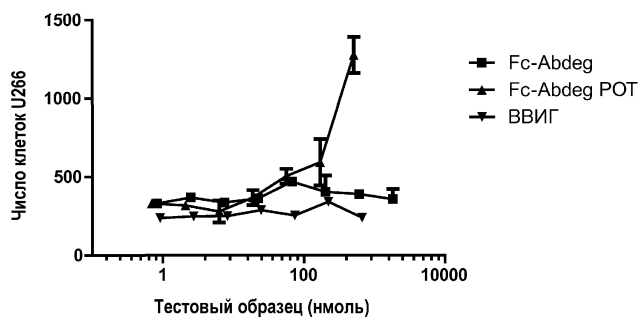
Фиг. 5



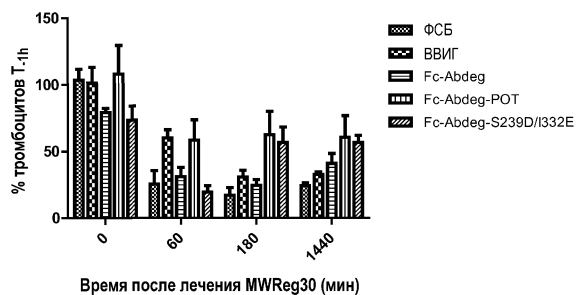
Фиг. 6



Фиг. 7

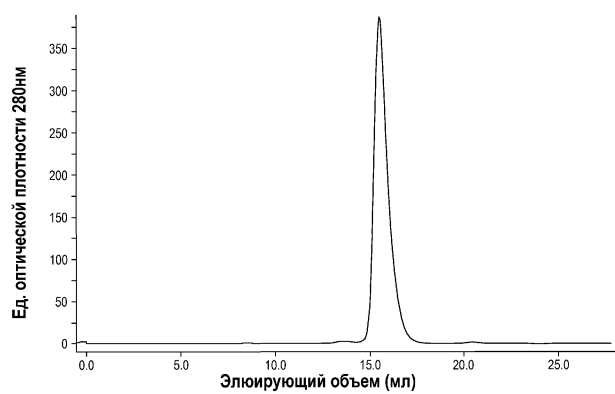


Фиг. 8



Фиг. 9

035324



Фиг. 10



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
