



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.07.20

(21) Номер заявки
201791984

(22) Дата подачи заявки
2016.03.08

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ УМЕНЬШЕНИЯ УРОВНЯ Fc-СОДЕРЖАЩИХ АГЕНТОВ В СЫВОРОТКЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ FcRn-АНТАГОНИСТОВ

(31) **62/130,076**

(32) **2015.03.09**

(33) **US**

(43) **2017.12.29**

(86) **PCT/IB2016/000398**

(87) **WO 2016/142782 2016.09.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АРДЖЕНКС БВБА (BE)

(72) Изобретатель:
**Онгена Николас Г.х., Драйер Торстен,
Ульрихс Петер (BE), Де Хард
Йоханнес, Бланшето Кристоф (NL)**

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

(56) WO-A1-2013074598
WO-A2-2006130834
D.A. PATEL ET AL.: "Neonatal Fc Receptor Blockade by Fc Engineering Ameliorates Arthritis in a Murine Model", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 187, no. 2, 15 July 2011 (2011-07-15), pages 1015-1022, XP055292443, US ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1003780 cited in the application the whole document * see in particular abstract; page 1016-1019 *

DILIP K. CHALLA ET AL.: "Autoantibody depletion ameliorates disease in murine experimental autoimmune encephalomyelitis", MABS, vol. 5, no. 5, 1 September 2013 (2013-09-01), pages 655-659, XP055292468, US ISSN: 1942-0862, DOI: 10.4161/mabs.25439 the whole document * see in particular abstract; pages 656, 657; Fig. 3 *

Argen-X: "arGEN-X N.V.", 20 June 2014 (2014-06-20), XP055292474, Retrieved from the Internet: URL: https://www.afm.nl/registers/emissions_documents/14414.pdf [retrieved on 2016-08-01] pages 80-84

Anonymous: "arGEN-X advances ARGX-113 into preclinical development for autoimmune disorders - Argenx", 24 April 2014 (2014-04-24), XP055292450, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.argen-x.com/en-GB/news-internal/argen-x-advances-argx-113-into-preclinical-development-for-autoimmune-disorders/60/> [retrieved on 2016-08-01] the whole document

Anonymous: "arGEN-X announces positive preclinical results for ARGX-113 Euronext", 19 August 2014 (2014-08-19), XP055292448, Retrieved from the Internet: URL: <https://www.euronext.com/nl/node/506652> [retrieved on 2016-08-01] the whole document

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, XP055049342, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt1143 the whole document * see in particular abstract; page 1284, 1285; Fig. 1-5 *

WO-A2-2013063186

Quinlin Hanson: "The role of the Immunoglobulin G1 Fc N-glycan in Fc[gamma]RIIIa affinity", 1 January 2014 (2014-01-01), XP055292649, ISBN: 978-1-321-59176-7 Retrieved from the Internet: URL: <http://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=5142&context=etd> [retrieved on 2016-08-03] the whole document

Sandra Grau ET AL.: "IgG core a-fucosylation and its impact on FcγRIIIa binding", 21 September 2011 (2011-09-21), XP055292648, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.cisbio.com/sites/default/files/ressources/cisbio-pr-igg-core-a-fucosylation-and-its-impact-on-fc-gamma-riiia-binding.pdf> [retrieved on 2016-08-01] the whole document

YUTAKA KANDA ET AL.: "Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types", GLYCOBIOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, US, vol. 17, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 104-118, XP002696785, ISSN: 0959-6658, DOI: 10.1093/GLYCOB/CWL057 [retrieved on 2006-09-29] the whole document

WO-A1-2015100299

(57) Предлагаются новые способы уменьшения уровня Fc-содержащих агентов (например, антител и иммуноадгезинов) в сыворотке объекта. Эти способы в целом включают введение объекту эффективного количества выделенного FcRn-антагониста, который специфично связывается с FcRn с повышенной аффинностью и уменьшенной зависимостью от pH относительно нативной

Fc-области. Раскрытые способы особенно полезны для лечения расстройств, опосредованных антителами (например, аутоиммунных заболеваний).

038178 B1

038178 B1

Родственные заявки

Настоящая заявка заявляет приоритет в отношении предварительной заявки США № 62/130076, поданной 9 марта 2015 г., которая включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

Уровень техники

Антитела иммуноглобулина гамма (IgG) играют ключевую роль в патологии многих расстройств, таких как аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания и расстройства, при которых патология характеризуется сверхэкспрессией IgG-антител (например, гипергаммаглобулинемия) (см., например, Junghans, *Immunologic Research* 16 (1):29(1997)).

Период полужизни IgG в сыворотке пролонгирован относительно периода полужизни в сыворотке других белков плазмы (Roopenian et al., *J. Immunology* 170: 3528 (2003), Junghans and Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5512 (1996)). Этот длительный период полужизни обусловлен, в частности, связыванием Fc-области IgG с Fc-рецептором, FcRn. Хотя FcRn первоначально характеризовали как неонатальный транспортный рецептор для материнского IgG, при этом он также функционирует у взрослых для защиты IgG от деградации. FcRn связывается с пиноцитированным IgG и защищает IgG от транспорта в деградирующие лизосомы путем возвращения его обратно во внеклеточный компартмент. Эта рециркуляция облегчается pH-зависимым связыванием IgG с FcRn, где взаимодействие IgG/FcRn сильнее при кислом эндосомном pH, чем при физиологическом pH.

Когда концентрация IgG в сыворотке достигает уровня, который превышает уровень доступных молекул FcRn, тогда несвязанный IgG будет не защищен от механизмов деградации и, следовательно, будет иметь уменьшенный период полужизни в сыворотке. Таким образом, ингибирование связывания IgG с FcRn снижает период полужизни IgG в сыворотке крови путем предотвращения эндосомной рециркуляции IgG. Соответственно агенты, которые противодействуют связыванию IgG с FcRn, могут быть полезны для регуляции, лечения или профилактики расстройств, опосредованных антителами, таких как аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания и т.д. Один из примеров способов противодействия связыванию Fc IgG с FcRn включает в себя генерацию блокирующих антител к FcRn (см., например, WO 2002/43658). Также были идентифицированы пептиды, которые связываются с FcRn и противодействуют его функции (см., например, US 2622022 и US 10101186). Кроме того, были идентифицированы полноразмерные антитела IgG, содержащие варианты Fc-рецепторов с усиленным связыванием с FcRn и уменьшенной pH-зависимостью, которые препятствуют связыванию FcRn с IgG (см., например, 8163881). Однако в данной области существует потребность в улучшенных способах лечения расстройств, опосредованных антителами.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предлагаются новые способы уменьшения уровня Fc-содержащих агентов (например, антител и иммуноадгезинов) в сыворотке объекта. Эти способы в целом включают введение объекту эффективного количества выделенного FcRn-антагониста, который специфично связывается с FcRn с повышенной аффинностью и уменьшенной pH-зависимостью относительно нативной Fc-области. Раскрытые способы особенно полезны для лечения расстройств, опосредованных антителами (например, аутоиммунных заболеваний).

Соответственно в одном аспекте в настоящем изобретении предлагается способ уменьшения уровня Fc-содержащего агента в сыворотке объекта, причем способ включает введение объекту эффективного количества выделенного FcRn-антагониста, содержащего вариант Fc-области или FcRn-связывающий фрагмент, где Fc-домены варианта Fc-области содержат аминокислоты Y, T, E, K, F и Y в EU-положениях 252, 254, 256, 433, 434 и 436 соответственно и где FcRn-антагонист вводят объекту в дозе примерно от 0,2 примерно до 200 мг/кг.

В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается способ уменьшения уровня Fc-содержащего агента в сыворотке объекта, причем способ включает введение объекту эффективного количества выделенного FcRn-антагониста, содержащего вариант Fc-области или его FcRn-связывающий фрагмент, где Fc-домены варианта Fc-области содержат аминокислоты Y, T, E, K, F и Y в EU-положениях 252, 254, 256, 433, 434 и 436 соответственно и где FcRn-антагонист вводят объекту по меньшей мере дважды в течение 20 дней.

Следующие воплощения применимы ко всем аспектам настоящего изобретения.

В некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят объекту с частотой, составляющей один раз каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней. В некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят объекту с частотой один раз в 4 дня. В некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят объекту с частотой, составляющей один раз в 7 дней. В некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят объекту 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 раз в течение 20 дней.

В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается способ уменьшения уровня Fc-содержащего агента в сыворотке объекта, причем способ включает введение объекту эффективного количества выделенного FcRn-антагониста, содержащего вариант Fc-области или его FcRn-связывающий фрагмент, где Fc-домены варианта Fc-области содержат аминокислоты Y, T, E, K, F и Y в EU-положениях 252, 254, 256, 433, 434 и 436 соответственно и где FcRn-антагонист вводят объекту с частотой, составляющей один раз каждые 48 ч в течение четырех недель.

В некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят объекту в дозе, составляющей примерно от 0,2 примерно до 200 мг/кг. В некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят объекту в дозе, составляющей примерно 0,2, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 25, 30, 50, 70, 100 или 200 мг/кг. В некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят объекту в дозе, составляющей примерно 10 мг/кг. В некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят объекту в дозе, составляющей примерно 20 мг/кг. В некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят объекту в дозе, составляющей примерно 25 мг/кг.

В другом аспекте настоящее раскрытие представляет способ уменьшения уровня Fc-содержащего агента в сыворотке объекта, причем способ включает введение объекту эффективного количества выделенного FcRn-антагониста, содержащего вариант Fc-области или его FcRn-связывающий фрагмент, где Fc-домены варианта Fc-области содержат аминокислоты Y, T, E, K, F и Y в EU-положениях 252, 254, 256, 433, 434 и 436 соответственно и где FcRn-антагонист вводят объекту в дозе примерно 25 мг/кг с частотой, составляющей один раз в четыре дня.

В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается способ уменьшения уровня Fc-содержащего агента в сыворотке объекта, причем способ включает введение объекту эффективного количества выделенного FcRn-антагониста, содержащего вариант Fc-области или его FcRn-связывающий фрагмент, где Fc-домены варианта Fc-области содержат аминокислоты Y, T, E, K, F и Y в EU-положениях 252, 254, 256, 433, 434 и 436 соответственно и где FcRn-антагонист вводят объекту в дозе примерно 25 мг/кг с частотой, составляющей один раз в семь дней.

В некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят внутривенно. В некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят подкожно. В некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят объекту в более чем одной дозе, где первая доза, вводимая объекту, вводится внутривенно и где одна или несколько из второй или последующих доз вводятся подкожно.

В некоторых воплощениях FcRn-антагонист не содержит вариабельную область антитела. В некоторых воплощениях FcRn-антагонист не содержит домен CH1. В некоторых воплощениях FcRn-антагонист не содержит свободный остаток цистеина. В некоторых воплощениях вариант Fc-области представляет собой Fc-область IgG. В некоторых воплощениях вариант Fc-области представляет собой Fc-область IgG1. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность Fc-доменов варианта Fc-области содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 2 или 3. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность Fc-доменов вариантов Fc-области состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях FcRn-антагонист состоит из варианта Fc-области, где аминокислотная последовательность Fc-доменов варианта Fc-области состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

В некоторых воплощениях вариант Fc-области обладает повышенной аффинностью к рецептору Fc-гамма относительно аффинности Fc-области IgG1 для рецептора Fc-гамма дикого типа. В некоторых воплощениях вариант Fc-области обладает повышенной аффинностью к CD16a. В некоторых воплощениях Fc-домены варианта Fc-области не содержат N-связанного гликана в EU-положении 297. В некоторых воплощениях FcRn-антагонист содержит множество молекул FcRn-антагонистов, где по меньшей мере 50% (необязательно, по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 95 или 99%) из множества молекул FcRn-антагонистов содержат вариант Fc-области или его FcRn-связывающий фрагмент, содержащий афукозилированный N-связанный гликан в EU-положении 297. В некоторых воплощениях FcRn-антагонист содержит множество молекул FcRn-антагонистов, где по меньшей мере 50% (необязательно, по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 95 или 99%) из множества молекул FcRn-антагонистов содержат вариант Fc-области или ее FcRn-связывающий фрагмент, содержащий N-связанный гликан, содержащий дополнительный остаток GlcNAc в точке ветвления в EU-положении 297.

В некоторых воплощениях вариант Fc-области связан с веществом, увеличивающим период полужизни. В некоторых воплощениях вещество, увеличивающее период полужизни, представляет собой полиэтиленгликоль или человеческий сывороточный альбумин.

В некоторых воплощениях Fc-содержащий агент представляет собой антитело или иммуноадгезин. В некоторых воплощениях Fc-содержащий агент представляет собой терапевтический или диагностический агент. В некоторых воплощениях Fc-содержащий агент представляет собой агент визуализации. В некоторых воплощениях Fc-содержащий агент представляет собой конъюгат антитела и лекарственного средства. В некоторых воплощениях Fc-содержащий агент представляет собой патогенное антитело. В некоторых воплощениях Fc-содержащий агент представляет собой аутоантитело.

В некоторых воплощениях объект имеет заболевание или расстройство, опосредованное антителом, где введение FcRn-антагониста объекту облегчает заболевание или расстройство. В некоторых воплощениях заболевание или расстройство можно лечить с использованием внутривенного иммуноглобулина (IVIg), плазмафереза и/или иммуноадсорбции. В некоторых воплощениях заболевание или расстройство, опосредованное антителом, представляет собой аутоиммунное заболевание. В некоторых воплощениях аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из отторжения аллогенного островкового трансплантата, гнездной алопеции, анкилозирующего спондилита, антифосфолипидного синдрома, аутоиммунной болезни Аддисона, болезни Альцгеймера, антинейтрофильных цитоплазматических аутоанти-

тел (ANCA), аутоиммунного заболевания надпочечной железы, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного миокардита, аутоиммунной нейтропении, аутоиммунного оофорита и орхита, аутоиммунной тромбоцитопении, аутоиммунной крапивницы, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, кардиомиопатии, синдрома Кастлемана, дерматита, вызванного целиакией-спру, иммунной дисфункции - синдрома хронической усталости, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIDP), синдрома Чарга-Стросса, рубцового пемфигоида, синдрома CREST, болезни холодового агглютинина, болезни Крона, дерматомиозита, расширенной кардиомиопатии, дискоидной волчанки, приобретенного буллезного эпидермолиза, эссенциальной смешанной криоглобулинемии, дефицита фактора VIII, фибромиалгии-фибромиозита, гломерулонефрита, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, синдрома Гудпасчера, реакции трансплантата против хозяина (РТПХ), тиреоидита Хашимото, гемофилии А, идиопатической мембранозной нефропатии, идиопатического фиброза легких, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), невропатии IgA, полиневропатии IgM, иммунной опосредованной тромбоцитопении, ювенильного артрита, болезни Кавасаки, плоского лишая, склеротического лишая, волчанки, болезни Менъера, смешанной болезни соединительной ткани, пемфигоида слизистой оболочки, рассеянного склероза, сахарного диабета 1-го типа, мультифокальной моторной невропатии (MMN), миастении гравис, паранеопластического буллезного пемфигоида, пемфигоида беременных, пузырьчатки обыкновенной, листовидной пузырьчатки, пернициозной анемии, узелкового полиартериита, полихондрита, полигландулярных синдромов, ревматической полимиалгии, полимиозита и дерматомиозита, первичной агаммаглобулинемии, первичного билиарного цирроза, псориаза, псориазического артрита, рецидивирующего полихондрита, феномена Рейно, синдрома Рейтера, ревматоидного артрита, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, отторжения трансплантатов твердых органов, синдрома мышечной скованности, системной красной волчанки, артериита Такаясу, токсического эпидермального некролиза (TEN), синдрома Стивенса-Джонсона (SJS), темпорального артериита/гигантоклеточного артериита, тромботической тромбоцитопенической пурпуры, язвенного колита, увеита, герпетического дерматита, васкулита, васкулитов, ассоциированных с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами, витилиго и гранулематоза Вегенера.

В некоторых воплощениях аутоиммунное заболевание представляет собой аутоиммунную каналопатию. В некоторых воплощениях каналопатия выбрана из группы, состоящей из аутоиммунного лимбического энцефалита, эпилепсии, оптикомиелита, миастенического синдрома Ламберт-Итона, миастении гравис, энцефалита с антителами к рецептору N-метил-D-аспартата, энцефалита с антителами к рецептору альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA), синдрома Морвана, нейротионии, педиатрических аутоиммунных нейропсихиатрических расстройств, связанных со стрептококковой инфекцией (PANDAS), и расстройства, ассоциированного с антителом к глициновому рецептору. В некоторых воплощениях расстройство, опосредованное антителом, представляет собой гиперглобулинемию.

В некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят объекту одновременно или последовательно с дополнительным терапевтическим агентом. В некоторых воплощениях дополнительный терапевтический агент представляет собой противовоспалительный агент. В некоторых воплощениях дополнительный терапевтический агент представляет собой агент, обедняющий фракцию лейкоцитов. В некоторых воплощениях агент, обедняющий фракцию лейкоцитов, представляет собой агент, обедняющий фракцию В-клеток. В некоторых воплощениях агент, обедняющий фракцию В-клеток, представляет собой антитело. В некоторых воплощениях агент, обедняющий фракцию В-клеток, представляет собой антитело, которое специфично 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 некоторых воплощениях дополнительный терапевтический агент представляет собой ритуксимаб, даклизумаб, базиликсимаб, муриномаб-CD3, инфликсимаб, адалимумаб, омализумаб, эфализумаб, натализумаб, тоцилизумаб, экулизумаб, голимумаб, канакинумаб, устекинумаб, белимумаб или их комбинацию.

В некоторых воплощениях объект представляет собой человека или яванскую макаку.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлены результаты экспериментов по определению влияния Fc-Abdeg и HEL-Abdeg на уровень меченного антитела (FR70-hIgG1) в сыворотке яванской макаки.

На фиг. 2 представлены результаты экспериментов по определению влияния Fc-Abdeg и HEL-Abdeg на общий уровень IgG в сыворотке яванской макаки.

На фиг. 3 представлены результаты экспериментов по определению влияния Fc-Abdeg и HEL-Abdeg на уровень альбумина у яванской макаки.

На фиг. 4 представлены результаты экспериментов по определению влияния Fc-Abdeg и IVIG на уровень меченого антитела (FR70-hIgG1) в сыворотке яванской макаки.

На фиг. 5 представлены результаты ИФА-анализов, сравнивающих аффинность Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT и Fc-Abdeg-S239D/I332E к человеческому CD16a.

На фиг. 6 представлены результаты ИФА-анализов, сравнивающих аффинность Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT и Fc-Abdeg-S239D/I332E к мышшиному CD16-2.

На фиг. 7 представлены результаты экспериментов по определению влияния Fc-Abdeg, Abdeg-POT

и Fc-AbdegS239D/I332E на ADCC-сигнал, индуцированный антителом к CD20, с использованием репортерного биоанализа ADCC на основе клеток Raji от Promega.

На фиг. 8 представлены результаты экспериментов по определению влияния Fc-Abdeg и Abdeg-POT на лизис клеток CD70+ U266, индуцированный антителом к CD70, *in vitro*.

На фиг. 9 представлены результаты экспериментов по определению влияния Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT, Fc-Abdeg-S239D/I332E и IVIG на уровень тромбоцитов в мышинной модели острой иммунной тромбоцитопении.

На фиг. 10 представлен результат иллюстративной очистки Fc-Abdeg гель-фильтрацией.

На фиг. 11 представлены результаты исследования эскалации дозы, измеряющего влияние различных однократных доз Fc-Abdeg на уровень меченого антитела (FR70-hIgG1) в сыворотке яванской макаки.

На фиг. 12 представлены результаты исследования эскалации дозы, измеряющего влияние различных однократных доз Fc-Abdeg на уровень меченого антитела (FR70-hIgG1) в сыворотке яванской макаки.

На фиг. 13 представлены результаты экспериментов по определению влияния 200 мг/кг Fc-Abdeg на уровень sIgA у яванской макаки.

На фиг. 14 представлены результаты экспериментов по определению влияния 200 мг/кг Fc-Abdeg на уровень sIgM у яванской макаки.

На фиг. 15 представлен фармакокинетический профиль различных однократных доз Fc-Abdeg у яванской макаки.

На фиг. 16 представлены результаты экспериментов по определению влияния повторяющихся многократных доз 20 мг/кг Fc-Abdeg на уровень sIgG у яванской макаки.

На фиг. 17 представлен фармакокинетический профиль Fc-Abdeg у яванской макаки, получавшей повторяющиеся многократные дозы 20 мг/кг Fc-Abdeg.

На фиг. 18 представлены результаты исследования эскалации дозы, измеряющего влияние различных однократных доз Fc-Abdeg на уровень эндогенного IgG в сыворотке яванской макаки.

На фиг. 19 представлен фармакокинетический профиль различных однократных доз Fc-Abdeg у яванской макаки.

На фиг. 20 представлены результаты исследования повторяющегося дозирования, измеряющего влияние различных повторяющихся доз Fc-Abdeg на уровень эндогенного IgG в сыворотке яванской макаки.

На фиг. 21 представлен фармакокинетический профиль различных повторяющихся доз Fc-Abdeg у яванской макаки.

На фиг. 22 представлены результаты исследования непрерывного дозирования, измеряющего влияние различных доз Fc-Abdeg на уровень эндогенного IgG в сыворотке яванской макаки.

На фиг. 23 представлены результаты исследования непрерывного дозирования, измеряющего влияние внутривенной загрузочной дозы 20 мг/кг Fc-Abdeg через 24 ч после ежедневного подкожного введения Fc-Abdeg в количестве 3 мг/кг в течение 28 дней, и последующего периода без лечения, составляющего 32 дня, у объекта - яванской макаки.

Подробное описание

В настоящем изобретении предлагаются новые способы уменьшения уровня Fc-содержащих агентов (например, антител и иммуноадгезинов) в сыворотке объекта. Эти способы в целом включают введение объекту эффективного количества выделенного FcRn-антагониста, который специфично связывается с FcRn с повышенной аффинностью и уменьшенной pH-зависимостью относительно нативной Fc-области. Раскрытые способы особенно полезны для лечения расстройств, опосредованных антителами (например, аутоиммунных заболеваний).

I. Определения.

Если в настоящем документе не указано иное, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, будут иметь значения, которые обычно понимаются специалистами в данной области техники. Смысл и границы терминов должны быть четкими, однако, в случае какой-либо скрытой двусмысленности приведенные здесь определения имеют преимущество над любым словарным или внешним определением. Кроме того, если иное не требуется по контексту, термины в единственном числе будут включать в себя множественное число, и термины во множественном числе будут включать термины в единственном числе. Как правило, номенклатура, используемая в связи с этим, и методы клеточной и тканевой культур, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики и белковой химии и химии нуклеиновых кислот и гибридизации, описанные в настоящем документе, хорошо известны и широко используются в данной области.

Для того чтобы настоящее изобретение было более понятным, некоторым терминам сначала даются определения.

Используемый в настоящем документе термин "FcRn-антагонист" относится к любому агенту, содержащему Fc-область (например, вариант Fc-области, раскрытый в настоящем документе), который специфично связывается с FcRn через Fc-область и ингибирует связывание иммуноглобулина с FcRn при

условии, что агент не является полноразмерным IgG-антителом.

Используемый в настоящем документе термин "Fc-область" относится к части нативного иммуноглобулина, образованного Fc-доменами двух его тяжелых цепей. Нативная Fc-область является гомодимерной.

Используемый в настоящем документе термин "вариант Fc-области" относится к Fc-области с одним или несколькими изменениями относительно нативной Fc-области. Изменение может включать аминокислотные замены, добавления и/или делеции, связывание дополнительных компонентов и/или изменение нативных гликанов. Этот термин охватывает гетеродимерные Fc-области, где каждый из составляющих Fc-доменов отличается. Примеры таких гетеродимерных Fc-областей включают, без ограничения, Fc-области, полученные с использованием технологии "выступов и впадин", как описано, например, в US 8216805, который включен в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. Термин также охватывает одноцепочечные Fc-области, где составляющие Fc-домены соединены вместе с помощью линкерного компонента, как описано, например, в US 20090252729 A1 и US 20110081345 A1, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

Используемый в настоящем документе термин "Fc-домен" относится к части одной тяжелой цепи иммуноглобулина, начинающейся в шарнирной области, расположенной непосредственно перед сайтом расщепления папаина и заканчивающейся на С-конце антитела. Соответственно полный Fc-домен содержит по меньшей мере часть шарнирного домена (например, верхнюю, среднюю и/или нижнюю шарнирную область), домена CH2 и домена CH3.

Используемый в настоящем документе термин "FcRn-связывающий фрагмент" относится к части Fc-области, которой достаточно для связывания FcRn.

Используемый в настоящем документе термин "EU-положение" относится к положению аминокислоты в EU-нумерации для Fc-области, описанной в Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969) и в Kabat et al., в "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. Health and Human Services, 5th edition, 1991.

Используемый в настоящем документе термин "домен CH1" относится к первому (самому аминоконцевому) домену константной области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая простирается от EU-положений 118-215. CH1-домен находится рядом с VH-доменом и аминоконцевым участком шарнирной области тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина и не является частью Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина.

Используемый в настоящем документе термин "шарнирная область" относится к части молекулы тяжелой цепи, которая соединяет CH1-домен с CH2-доменом. Эта шарнирная область содержит приблизительно 25 остатков и является гибкой, что позволяет двум N-концевым антигенсвязывающим областям перемещаться независимо друг от друга. Шарнирные области можно разделить на три отдельные области: верхние, средние и нижние шарнирные домены (Roux et al. J. Immunol. 161: 4083 (1998)). FcRn-антагонисты настоящего изобретения могут включать всю или часть шарнирной области.

Используемый в настоящем документе термин "CH2-домен" относится к части молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина, которая протягивается примерно от EU-положений 231-340.

Используемый в настоящем документе термин "CH3-домен" включает часть молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит приблизительно 110 остатков из N-конца CH2-домена, например, примерно от положений 341-446 (система нумерации EU).

Используемый в настоящем документе термин "FcRn" относится к неонатальному рецептору Fc. Иллюстративные молекулы FcRn включают человеческий FcRn, кодируемый геном FCGRT, представленным в RefSeq NM_004107.

Используемый в настоящем документе термин "CD16" относится к FcγRIII Fc-рецепторам, которые необходимы для антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). Иллюстративные молекулы CD16 включают человеческий CD16a, представленный в RefSeq NM_000569.

Используемый в настоящем документе термин "свободный цистеин" относится к нативному или сконструированному аминокислотному остатку цистеина, который присутствует, по существу, в восстановленной форме в зрелом FcRn-антагонисте.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулина, содержащим четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие цепи (L), связанные между собой дисульфидными связями, а также к их мультимерам (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (сокращенно VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (CL). Области VH и VL могут дополнительно подразделяться на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR).

Используемый в настоящем документе термин "N-связанный гликан" относится к N-связанному гликану, присоединенному к азоту (N) в боковой цепи аспарагина в секвоне (то есть в последовательности Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, где X - любая аминокислота, кроме пролина), присутствующем в CH2-

домене Fc-области. Такие N-гликаны полностью описаны, например, в Drickamer K., Taylor M.E. (2006). *Introduction to Glycobiology, 2nd ed.*, которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Используемый в настоящем документе термин "афукозилированный" относится к N-связанному гликану, который не содержит коровую молекулу фукозы, как описано в US 8067232, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Используемый в настоящем документе термин "дополнительный остаток GlcNAc в точке ветвления" относится к N-связанному гликану, содержащему молекулу N-ацетилглюкозамина (GlcNAc), связанную с коровой молекулой маннозы, как описано в US 8021856, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Используемый в настоящем документе термин "расстройство, опосредованное антителом", относится к любому заболеванию или расстройству, вызванному или усугубляемому наличием антитела у объекта.

Используемый в настоящем документе термин "Fc-содержащий агент" представляет собой любую молекулу, которая содержит Fc-область.

Используемый в настоящем документе термин "агент, обедняющий фракцию лейкоцитов" относится к агенту, который при введении уменьшает количество лейкоцитов у объекта.

Используемый в настоящем документе термин "агент, обедняющий фракцию В-клеток" относится к агенту, который при введении уменьшает количество В-клеток у объекта.

Используемый в настоящем документе термин "агент, обедняющий фракцию Т-клеток" относится к агенту, который при введении уменьшает количество Т-клеток у объекта.

Используемый в настоящем документе термин "аутоиммунная каналопатия" относится к заболеваниям, вызванным аутоантителами к субъединице ионного канала или молекуле, которая регулирует канал.

Используемый в настоящем документе термин "лечить" и "лечение (treating) и (treatment)" относится к терапевтическим или профилактическим мерам, описанным в настоящем документе. В способах "лечения" применяют введение объекту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, например объекту, имеющему заболевание или расстройство, ассоциированное с IL-6 (например, воспаление и злокачественное новообразование), или предрасположенному к такому заболеванию или расстройству, для предотвращения, излечения, задержки, уменьшения тяжести или ослабления одного или нескольких симптомов заболевания или расстройства или рецидивирующего заболевания или расстройства, или с целью продления выживания объекта, превышающего ожидаемое в отсутствии такого лечения. Используемый в настоящем документе термин "объект" включает любое животное, включая человека.

Используемый в настоящем документе термин "иммуноадгезин" относится к антителоподобной молекуле, которая содержит функциональный домен связывающего белка (например, рецептора, лиганда или молекулы клеточной адгезии) с Fc-областью.

II. Способы уменьшения уровня Fc-содержащих агентов в сыворотке.

В одном аспекте в настоящем изобретении предлагаются способы уменьшения уровня Fc-содержащих агентов (например, антител и иммуноадгезинов) в сыворотке объекта, причем способы включают введение объекту эффективного количества выделенного FcRn-антагониста, который специфично связывается с FcRn с повышенной аффинностью и уменьшенной pH-зависимостью относительно нативной Fc-области (например, описанные в настоящем документе FcRn-антагонисты).

Как показано в настоящем документе, введение FcRn-антагониста объекту в дозе примерно от 0,2 примерно до 200 мг/кг неожиданно является эффективным. Соответственно в некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят объекту в дозе, составляющей примерно от 0,2 примерно до 200 мг/кг (например, от 0,2 до 200 мг/кг). В некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят объекту в дозе, составляющей примерно 0,2, 2, 20, 70 или 200 мг/кг (например, 0,2, 2, 20, 70 или 200 мг/кг). В некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят объекту в дозе, составляющей примерно 20 мг/кг (например, 20 мг/кг).

Как показано в настоящем документе, схема многократного повторяющегося дозирования неожиданно превосходит однократную дозу. Соответственно в некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят объекту по меньшей мере дважды в течение 20 дней. В некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят объекту с частотой, составляющей один раз каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней. В некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят объекту 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 раз в течение 20 дней. В некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят объекту с частотой, составляющей один раз в 4 дня. В некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят объекту каждые 4 дня в течение 13 дней (то есть в дни 1, 5, 9 и 13). В некоторых воплощениях 20 мг/кг FcRn-антагониста вводят объекту каждые 4 дня в течение 13 дней (то есть в дни 1, 5, 9 и 13).

FcRn-антагонист можно вводить объекту любым способом. Способы введения включают, но не ограничиваются ими, внутрикожные, внутримышечные, внутривенные, подкожные, интраназальные, эпидуральные и пероральные пути введения. Композицию может быть введена, например, путем инфузии или болюсной инъекции. В некоторых воплощениях FcRn-антагонист вводят с по-

мощью внутривенной инфузии.

С помощью способов, раскрытых в настоящем документе, может быть уменьшен уровень любого Fc-содержащего агента в сыворотке. В некоторых воплощениях Fc-содержащий агент представляет собой антитело или иммуноадгезин. В некоторых воплощениях Fc-содержащий агент представляет собой терапевтический или диагностический агент. В некоторых воплощениях Fc-содержащий агент представляет собой агент визуализации. В некоторых воплощениях Fc-содержащий агент представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство. В некоторых воплощениях Fc-содержащий агент представляет собой патогенное антитело, например аутоантитело. В некоторых воплощениях объект имеет опосредованное антителом заболевание или расстройство. В некоторых воплощениях заболевание или расстройство, опосредованное антителом, ассоциировано с аутоантителом.

Уменьшение уровня Fc-содержащих агентов (например, антител и иммуноадгезинов) в сыворотке особенно применимо для лечения опосредованных антителами расстройств (например, аутоиммунных заболеваний). Соответственно в одном аспекте в настоящем изобретении предлагаются способы лечения объекта, имеющего опосредованное антителом расстройство (например, аутоиммунное заболевание), причем способ включает введение объекту эффективного количества композиции FcRn-антагониста, раскрытой в настоящем документе.

Любое опосредованное антителом расстройство может быть подвергнуто лечению с применением способов, описанных в настоящем документе. В некоторых воплощениях опосредованное антителом расстройство представляет собой такое расстройство, которое поддается лечению с помощью IVIG. В некоторых воплощениях опосредованное антителом расстройство представляет собой аутоиммунное заболевание. Неограничивающие аутоиммунные заболевания включают отторжение аллогенного островкового трансплантата, гнездную алопецию, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром, аутоиммунную болезнь Аддисона, болезнь Альцгеймера, антинейтрофильные цитоплазматические аутоантитела (ANCA), аутоиммунное заболевание надпочечной железы, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный миокардит, аутоиммунную нейтропению, аутоиммунный оофорит и орхит, аутоиммунную тромбоцитопению, аутоиммунную крапивницу, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, кардиомиопатию, синдром Кастлемана, дерматит, связанный с целиакией-спру, иммунную дисфункцию - синдром хронической усталости, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (CIDP), синдром Чарга-Стросса, рубцовый пемфигоид, синдром CREST, болезнь холодового агглютинина, болезнь Крона, дерматомиозит, расширенную кардиомиопатию, дисконидную волчанку, приобретенный буллезный эпидермолиз, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, дефицит фактора VIII, фибромиалгию-фибромиозит, гломерулонефрит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, синдром Гудпасчера, реакцию трансплантата против хозяина (РТПХ), тиреоидит Хашимото, гемофилию А, идиопатическую мембранозную нефропатию, идиопатический фиброз легких, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), нейропатию IgA, полинейропатии IgM, иммунную опосредованную тромбоцитопению, ювенильный артрит, болезнь Кавасаки, плоский лишай, склеротический лишай, волчанку, болезнь Меньера, смешанную болезнь соединительной ткани, пемфигоид слизистой оболочки, рассеянный склероз, сахарный диабет 1-го типа, мультифокальную моторную нейропатию (MMN), миастению гравис, паранеопластический буллезный пемфигоид, пузырьчатку обыкновенную, листовидную пузырьчатку, пернициозную анемию, узелковый полиартериит, полихондрит, полигландулярные синдромы, ревматическую полимиалгию, полимиозит и дерматомиозит, первичную агаммаглобулинемию, первичный билиарный цирроз, псориаз, псориатический артрит, феномен Рейно, синдром Рейтера, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермию, синдром Шегрена, отторжение трансплантатов твердых органов, синдром мышечной скованности, системную красную волчанку, артериит Такаюсу, токсический эпидермальный некролиз (TEN), синдром Стивенса-Джонсона (SJS), темпоральный артериит/гигантоклеточный артериит, тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру, язвенный колит, увеит, герпетиформный дерматит, васкулит, васкулиты, ассоциированные с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами, витилиго и гранулематоз Вегенера.

В некоторых воплощениях аутоиммунное заболевание представляет собой аутоиммунную каналопатию. Неограничивающие каналопатии включают оптикомиелит, миастенический синдром Ламберт-Итона, миастению гравис, энцефалит с антителами к рецептору N-метил-D-аспартата (NMDA), энцефалит с антителами к рецептору альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA), синдром Морвана и расстройство, ассоциированное с антителом к глициновому рецептору.

Способы настоящего изобретения особенно подходят для лечения опосредованных антителом расстройств, характеризующихся сверхпродуцированием сывороточного иммуноглобулина. Соответственно в некоторых воплощениях композиции FcRn-антагонистов используют для лечения гипергаммаглобулинемии.

Способы настоящего изобретения могут также использоваться в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами. В некоторых воплощениях дополнительный терапевтический агент представляет собой противовоспалительное средство. Любой воспалительный агент можно использовать в комбинации с композициями, описанными в настоящем документе. В некоторых воплощениях терапевтический агент представляет собой ритуксимаб, даклизумаб, базиликсимаб, муро-

номаб-cd3, инфликсимаб, адалимумаб, омализумаб, эфализумаб, натализумаб, тоцилизумаб, экулизумаб, голимумаб, канакинумаб, устекинумаб или белимумаб. В некоторых воплощениях дополнительным терапевтическим агентом является агент, обедняющий фракцию лейкоцитов (например, агент обеднения фракции В-клеток или Т-клеток). Любой агент, обедняющий фракцию лейкоцитов, можно использовать в комбинации с композициями FcRn-антагонистов, описанными в настоящем документе. В некоторых воплощениях агент, обедняющий фракцию лейкоцитов, представляет собой агент, обедняющий фракцию В-клеток. В некоторых воплощениях агент, обедняющий фракцию лейкоцитов, представляет собой анти-тело против маркера клеточной поверхности. Подходящие маркеры клеточной поверхности включают, без ограничения, CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD70, CD72, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85 или CD86. FcRn-антагонист и дополнительный терапевтический агент(ы) могут быть введены объекту одновременно или последовательно посредством одного или нескольких путей введения.

Способы настоящего изобретения также хорошо подходят для быстрого уменьшения уровня Fc-содержащего агента в сыворотке объекта. Такой быстрый клиренс предпочтителен в тех случаях, где Fc-содержащий агент является токсичным (например, конъюгат антитело-лекарственное средство или агент, который является иммуногенным), поскольку это уменьшает воздействие лекарственного средства на объект. Быстрый клиренс также является предпочтительным в случаях, когда Fc-содержащий агент представляет собой агент визуализации, для которого требуется низкий уровень агента в сыворотке для облегчения визуализации. Соответственно в некоторых воплощениях композиции FcRn-антагонистов используют для уменьшения уровня Fc-содержащего агента (например, агента визуализации) в сыворотке объекта, которому вводили Fc-содержащий агент. Уровень любого Fc-содержащего агента (например, терапевтического или диагностического агента) в сыворотке может быть уменьшен с использованием описанных в настоящем документе FcRn-антагонистов. Неограничивающие примеры Fc-содержащих агентов включают агенты визуализации (например, меченые антитела), конъюгаты антитело-лекарственное средство или иммуногенные агенты (например, антитела животного, но не человека, иммуноадгезины). FcRn-антагонист можно вводить одновременно с Fc-содержащим агентом или последовательно (например, до или после Fc-содержащего агента).

Кроме того, при заболеваниях или состояниях, требующих введения терапевтического агента, объект часто вырабатывает антитела (например, антитела против лекарственных средств) против терапевтического агента, которые, в свою очередь, не позволяют терапевтическому агенту быть доступным по назначению для терапевтических целей или вызывают побочную реакцию у объекта. Соответственно описанные в настоящем документе способы также могут быть использованы для удаления антител (например, антител против лекарственных средств) против терапевтического агента, которые вырабатываются у объекта.

Способы, раскрытые в настоящем документе, также могут быть использованы в комбинации с терапевтическим белком для повышения эффективности терапевтического белка путем уменьшения уровня IgG; где IgG-антитела ответственны за уменьшенную биодоступность терапевтического белка. В некоторых воплощениях в настоящем изобретении предлагается способ лечения объекта, имеющего расстройство, являющегося результатом иммунного ответа на фактор свертывания крови, причем способ включает введение объекту терапевтически эффективного количества FcRn-антагонистов, описанных в настоящем документе. Подходящие факторы свертывания включают, без ограничения, фибриноген, протромбин, фактор V, фактор VII, фактор VIII, фактор IX, фактор X, фактор XI, фактор XII, фактор XIII или фактор фон Виллебранда. Этот метод может быть использован для регуляции или лечения или предотвращения иммунного ответа на фактор свертывания у пациента, страдающего, например, от гемофилии А или гемофилии В. В некоторых воплощениях способ может быть использован для регуляции или лечения иммунного ответа, например, на терапевтический эритропоэтин у пациента, страдающего истинной эритроцитарной аплазией (PRCA).

FcRn отвечает за транспорт материнских антител через плаценту к плоду у беременной женщины. Соответственно, если беременной особи женского пола вводят Fc-содержащий агент (например, терапевтическое антитело), агент может контактировать с плодом в результате FcRn-опосредованного транспорта через плаценту. Чтобы избежать любого потенциального вредного эффекта Fc-содержащего агента в отношении развития плода, было бы предпочтительно блокировать функцию FcRn. Соответственно в настоящем изобретении предлагается способ предотвращения плацентарного переноса Fc-содержащего агента (например, терапевтического антитела) плоду у беременной женщины, причем способ включает введение женщине композиций FcRn-антагонистов, описанных в настоящем документе, либо одновременно, либо последовательно (до или после) с Fc-содержащим агентом.

Способы, описанные в настоящем документе, также могут быть использованы для лечения воспалительных заболеваний, включая, но не ограничиваясь ими, астму, язвенный колит и синдром воспаленного кишечника, аллергию, включающую аллергический ринит/синусит, кожные аллергии (уртикария/крапивница, ангиодистрофия, атопический дерматит), пищевую аллергию, аллергию на лекарства, аллергию на насекомых, мастоцитоз, артрит, включая остеоартрит, ревматоидный артрит и спондилоартропатии.

Успешная реализация генной терапии для лечения заболевания или состояния может быть затруднена выработкой антител, специфичных к терапевтическому белку, кодируемому трансгеном, а также, возможно, к вектору, используемому для доставки трансгена. Соответственно композиции FcRn-антагонистов, раскрытые в настоящем документе, могут быть введены в комбинации с генной терапией для усиления пользы кодируемого терапевтического белка за счет уменьшения уровня IgG. Эти способы особенно полезны в ситуациях, когда IgG-антитела ответственны за уменьшенную биодоступность вектора генной терапии или кодируемого терапевтического белка. Вектор генной терапии может быть, например, вирусным вектором, таким как аденовирус и адено-ассоциированный вирус. Заболевания, которые могут подвергаться лечению с помощью генной терапии, включают, но не ограничиваются ими, кистозный фиброз, гемофилию, PRCA, мышечную дистрофию или лизосомные болезни накопления, такие как, например, болезнь Гоше и болезнь Фабри.

Любой объект можно лечить с использованием способов, описанных в настоящем документе. В некоторых воплощениях объект представляет собой человека или яванскую макаку.

III. FcRn-антагонисты.

Способы, раскрытые в настоящем документе, в целом включают введение объекту эффективного количества выделенного FcRn-антагониста, где FcRn-антагонист специфично связывается с FcRn с повышенной аффинностью и уменьшенной pH-зависимостью относительно нативной Fc-области. В общем, эти FcRn-антагонисты содержат вариант Fc-области или ее FcRn-связывающий фрагмент, который специфично связывается с FcRn с повышенной аффинностью и уменьшенной pH-зависимостью относительно нативной Fc-области. FcRn-антагонисты ингибируют связывание Fc-содержащих агентов (например, антител и иммуноадгезинов) с FcRn *in vivo*, что приводит к повышенной скорости деградации Fc-содержащих агентов и, вместе с тем, к уменьшенному уровню этих агентов в сыворотке.

Как показано в настоящем документе, выделенный вариант Fc-области (например, вариант Fc-области, содержащий аминокислоты Y, T, E, K, F и Y в EU-положениях 252, 254, 256, 433, 434 и 436 соответственно) является более эффективным FcRn-антагонистом *in vivo*, чем полноразмерное антитело, содержащее тот же вариант Fc-области. Соответственно в некоторых воплощениях композиции FcRn-антагонистов не являются полноразмерными антителами. В некоторых воплощениях композиции FcRn-антагонистов не содержат вариабельный домен антитела. В некоторых воплощениях композиции FcRn-антагонистов не содержат вариабельный домен антитела или CH1-домен. Однако в некоторых воплощениях композиции FcRn-антагонистов могут содержать вариант Fc-области, связанный с одним или несколькими дополнительными связывающими доменами или компонентами, включая вариабельные домены антител.

Любая Fc-область может быть изменена с получением варианта Fc-области для использования в композициях FcRn-антагонистов, описанных в настоящем документе. В общем, Fc-область или ее FcRn-связывающий фрагмент имеет происхождение из иммуноглобулина человека. Однако следует понимать, что Fc-область может быть получена из иммуноглобулинов любых других видов млекопитающих, включая, например, виды верблюдовых, грызунов (например, мыши, крысы, кролика, морской свинки) или приматов, не относящихся к человеку (например, шимпанзе, макаки). Кроме того, Fc-область или ее часть могут быть получены из иммуноглобулина любого класса, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и иммуноглобулина любого изотипа, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых воплощениях Fc-область представляет собой Fc-область IgG (например, область IgG человека). В некоторых воплощениях Fc-область представляет собой Fc-область IgG1 (например, область IgG1 человека). В некоторых воплощениях Fc-область представляет собой химерную Fc-область, содержащую части нескольких различных Fc-областей. Подходящие примеры химерных Fc-областей приведены в US 20110243966 A1, который включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Различные последовательности генов Fc-области (например, последовательности генов константной области человека) доступны в виде общедоступных депонированных последовательностей. Понятно, что объем настоящего изобретения охватывает аллели, варианты и мутации Fc-областей.

Fc-область может быть дополнительно укорочена или может содержать внутренние делеции для получения ее минимального FcRn-связывающего фрагмента. Способность фрагмента Fc-области связываться с FcRn может быть определена с использованием любого анализа связывания, известного в данной области, например ИФА.

Чтобы повысить возможности производства FcRn-антагонистов, раскрытых в настоящем документе, предпочтительно, чтобы составляющие Fc-области не содержали никаких остатков цистеина, не связанных в виде дисульфидов. Соответственно в некоторых воплощениях Fc-области не содержат свободный остаток цистеина.

Любой Fc-вариант или его FcRn-связывающий фрагмент, который специфично связывается с FcRn с повышенной аффинностью и уменьшенной pH-зависимостью относительно нативной Fc-области, может быть использован в композициях FcRn-антагонистов, раскрытых в настоящем документе. В некоторых воплощениях вариант Fc-области содержит аминокислотные изменения, замены, вставки и/или делеции, которые придают желаемые характеристики. В некоторых воплощениях вариант Fc-области или фрагмент содержит аминокислоты Y, T, E, K, F и Y в EU-положениях 252, 254, 256, 433, 434 и 436 соот-

ветственно. Неограничивающие примеры аминокислотных последовательностей, которые могут быть использованы в вариантах Fc-областей, приведены в табл. 1 настоящего документе. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность Fc-доменов варианта Fc-области содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность Fc-доменов варианта Fc-области состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, 2 или 3. В некоторых воплощениях FcRn-антагонист состоит из варианта Fc-области, где аминокислотная последовательность Fc-доменов варианта Fc-области состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

Таблица 1
Аминокислотные последовательности неограничивающих примеров вариантов Fc-областей

SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
1	CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL <u>Y</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>E</u> PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLSDSFGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL <u>K</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>G</u>
2	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL <u>Y</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>E</u> PEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDSFGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL <u>K</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>G</u> PGK
3	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL <u>Y</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>E</u> PEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDSFGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL <u>K</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>G</u> PG

Аминокислоты в EU-положениях 252, 254, 256, 433 и 434 подчеркнуты

В некоторых воплощениях вариант Fc-области имеет измененную (например, увеличенную или уменьшенную) аффинность связывания для дополнительного Fc-рецептора. Вариант Fc-области может иметь измененную (например, увеличенную или уменьшенную) аффинность связывания для одного или нескольких рецепторов Fcγ, например FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIB (CD32), FcγRIIA (CD16a) и FcγRIIB (CD16b). Можно использовать любые известные в данной области способы изменения аффинности к дополнительному рецептору Fc. В некоторых воплощениях изменяют аминокислотную последовательность варианта Fc-области.

В некоторых воплощениях вариант Fc-области содержит неприродный аминокислотный остаток в одном или нескольких положениях, выбранных 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, согласно нумерации EU-индекса, как указано у Kabat. Необязательно, Fc-область может содержать неприродный аминокислотный остаток в дополнительных и/или альтернативных положениях, известных специалисту в данной области (см., например, патенты США №№ 5624821, 6277375, 6377056, патентные публикации PCT WO 01/58957, WO 02/06919, WO 04/016750, WO 04/029207, WO 04/035752 и WO 05/040217, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

В некоторых воплощениях вариант Fc-области содержит по меньшей мере один неприродный аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235 W, 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, 243W, 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, 269G, 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 согласно нумерации с использованием EU-индекса, как указано у Kabat. Необязательно, Fc-область может содержать дополнительные и/или альтернативные неприродные аминокислотные остатки, известные специалистам в данной области (см., например, патенты США № 5624821, 6277375, 6377056, публикации патентных заявок PCT WO 01/58957; WO 02/06919, WO 04/016750, WO 04/029207, WO 04/035752 и WO 05/040217, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

Другие известные Fc-варианты, которые могут быть использованы в FcRn-антагонистах, раскрытых в настоящем документе, включают без ограничений те, которые описаны в Ghetie et al., 1997, Nat. Bio-

tech. 15:637-40; Duncan et al., 1988, Nature 332:563-564; Lund et al., 1991, J. Immunol., 147:2657-2662; Lund et al., 1992, Mol. Immunol., 29:53-59; Alegre et al., 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins et al., 1995, Proc Natl. Acad Sci USA, 92:11980-11984; Jefferis et al., 1995, Immunol Lett., 44:111-117; Lund et al., 1995, Faseb J., 9:115-119; Jefferis et al., 1996, Immunol Lett., 54:101-104; Lund et al., 1996, J. Immunol., 157:4963-4969; Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie et al., 2000, J. Immunol., 164:4178-4184; Reddy et al., 2000, J. Immunol., 164:1925-1933; Xu et al., 2000, Cell Immunol., 200:16-26; Idusogie et al., 2001, J. Immunol., 166:2571-2575; Shields et al., 2001, J Biol. Chem., 276: 6591-6604; Jefferis et al., 2002, Immunol Lett., 82: 57-65; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans., 30: 487-490); патентах США №№ 5624821; 5885573; 5677425; 6165745; 6277375; 5869046; 6121022; 5624821; 5648260; 6528624; 6194551; 6737056; 6821505; 6277375; патентных публикациях США № 2004/0002587 и в патентных публикациях PCT 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 настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых воплощениях вариант Fc-области представляет собой гетеродимер, где составляющие Fc-домены отличаются друг от друга. Способы получения гетеродимеров Fc известны в данной области (см., например, US 8216805, который включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). В некоторых воплощениях вариант Fc-области представляет собой одноцепочечную Fc-область, где составляющие Fc-домены соединены вместе линкером. Способы получения одноцепочечных Fc-областей известны в данной области (см., например, US 20090252729 A1 и US 20110081345 A1, которые включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

Считается, что патогенные IgG-антитела, наблюдаемые при аутоиммунных заболеваниях, являются либо патогенными триггерами для этих заболеваний, либо способствуют прогрессированию заболевания и опосредуют заболевание посредством ненадлежащей активации клеточных Fc-рецепторов. Агрегированные аутоантитела и/или аутоантитела, образующие комплекс с собственными антигенами (иммунные комплексы), связываются с активирующими Fc-рецепторами, вызывая многочисленные аутоиммунные заболевания (которые частично возникают из-за иммунологически опосредуемого воспаления против собственных тканей) (см., например, Clarkson et al., NEJM 314 (9), 1236-1239 (2013)); US 20040010124 A1; US 20040047862 A1 и US 2004/0265321 A1, которые включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Соответственно для лечения опосредованных антителами расстройств (например, аутоиммунных заболеваний) было бы предпочтительно как удаление вредных аутоантител, так и блокировка взаимодействия иммунных комплексов этих антител с использованием активации Fc-рецепторов (например, Fcγ-рецепторов, таких как CD16a).

Соответственно в некоторых воплощениях вариант Fc-области FcRn-антагониста демонстрирует повышенное связывание с CD16a (например, CD16a человека). Это особенно предпочтительно тем, что позволяет FcRn-антагонисту дополнительно выступать антагонистом индуцированного иммунным комплексом воспалительного ответа аутоантител, предназначенных для удаления путем ингибирования FcRn. Могут быть использованы любые известные в данной области способы увеличения аффинности к CD16a (например, человеческому CD16a). В некоторых воплощениях FcRn-антагонист содержит вариант Fc-области, содержащий N-связанный гликан (например, в EU-положении 297). В этом случае возможно увеличение аффинности связывания FcRn-антагониста с CD16a путем изменения структуры гликанов. Изменения N-связанного гликана Fc-областей хорошо известны в данной области. Например, было показано, что афукозилированные N-связанные гликаны или N-гликаны, имеющие структуру с дополнительным остатком GlcNAc в точке ветвления, демонстрируют повышенную аффинность к CD16a. Соответственно в некоторых воплощениях N-связанный гликан афукозилирован. Афукозилирование может быть достигнуто с использованием любых способов, известных в данной области. Например, FcRn-антагонист может экспрессироваться в клетках, лишенных фукозилтрансферазы, так что фукоза не добавляется к N-связанному гликану в EU-положении 297 варианта Fc-области (см., например, US 0867232, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). В некоторых воплощениях N-связанный гликан имеет структуру с дополнительным остатком GlcNAc в точке ветвления. Структура с дополнительным остатком GlcNAc в точке ветвления может быть получена с использованием любых известных в данной области средств. Например, FcRn-антагонист может экспрессироваться в клетках, экспрессирующих β1-4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III (GnTIII), так что дополнительный остаток GlcNAc в точке ветвления добавляется к N-связанному гликану в EU-положении 297 варианта Fc-области (см., например, US 8021856, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Дополнительно или альтернативно, изменения N-связанной структуры гликана также могут быть достигнуты с помощью ферментативных средств *in vitro*.

В некоторых воплощениях FcRn-антагонист содержит множество молекул FcRn-антагонистов, где по меньшей мере 50% (необязательно, по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 95 или 99%) из множества молекул FcRn-антагонистов включают вариант Fc-области или его FcRn-связывающий фрагмент, содержащий афукозилированный N-связанный гликан в EU-положении 297.

В некоторых воплощениях FcRn-антагонист содержит множество молекул FcRn-антагонистов, где по меньшей мере 50% (необязательно, по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 95 или 99%) из множества моле-

кул FcRn-антагонистов включают вариант Fc-области или ее FcRn-связывающий фрагмент, содержащий N-связанный гликан, содержащий дополнительный остаток GlcNac в точке ветвления в EU-положении 297.

В некоторых воплощениях вариант Fc-области не содержит N-связанного гликана. Это может быть достигнуто с использованием любых известных в данной области методов. Например, Fc-вариант может быть экспрессирован в клетке, которая не способна к N-связанному гликозилированию. Дополнительно или альтернативно, аминокислотная последовательность Fc-варианта может быть изменена для предотвращения или ингибирования N-связанного гликозилирования (например, путем мутации секвона NXT). Альтернативно, Fc-вариант может быть синтезирован в бесклеточной системе (например, с помощью химического синтеза).

В некоторых воплощениях молекулы FcRn-антагонистов могут быть модифицированы, например, путем ковалентного присоединения молекулы (например, связывающего или визуализирующего компонента) к FcRn-антагонисту, так что ковалентное присоединение не предотвращает специфичного связывания FcRn-антагониста с FcRn. Например, но не в качестве ограничения, FcRn-антагонист может быть модифицирован гликозилированием, ацетилированием, пэгиллированием, фосфорилированием, амидированием, модификацией известными защищающими блокирующими группами, протеолитическим расщеплением, связыванием с клеточным лигандом или другим белком и т.д.

В некоторых воплощениях FcRn-антагонист содержит вариант Fc-области, связанной с веществом, увеличивающим период полужизни. Используемый в настоящем документе термин "вещество, увеличивающее период полужизни" относится к любой молекуле, которая при соединении с FcRn-антагонистом, раскрытым в настоящем документе, увеличивает период полужизни FcRn-антагониста. Любое вещество, увеличивающее период полужизни, может быть связано (ковалентно или нековалентно) с FcRn-антагонистом. В некоторых воплощениях вещество, увеличивающее период полужизни, представляет собой полиэтиленгликоль или человеческий сывороточный альбумин. В некоторых воплощениях FcRn-антагонист связан со связывающей молекулой, которая специфично связывается с увеличивающим период полужизни веществом, присутствующим у объекта, таким как молекула или клетка, переносимая кровью, как например, сывороточный альбумин (например, человеческий сывороточный альбумин), IgG, эритроциты и т.д.

IV. Фармацевтические композиции.

В некоторых воплощениях в способах применяют фармацевтические композиции, содержащие FcRn-антагонист или композицию FcRn-антагониста, раскрытую в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, E.W. Martin. Примеры вспомогательных веществ могут включать крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и тому подобное. Композиция также может содержать реагенты для буферизации pH и смачивающие или эмульгирующие агенты.

Фармацевтическая композиция может быть приготовлена для парентерального введения (например, внутривенного или внутримышечного) с помощью болюсной инъекции. Составы для инъекций могут быть представлены в стандартной лекарственной форме, например в ампулах или в мультидозовых контейнерах с добавлением консерванта. Композиции могут принимать такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и содержат составляющие агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, активный ингредиент может быть представлен в виде порошка для восстановления с использованием подходящего носителя, например воды, свободной от пирогена.

В раскрытых способах FcRn-антагонисты могут быть связаны с хелаторами, такими как те, которые описаны в патенте США № 5326856. Затем пептид-хелаторный комплекс может быть радиоактивно помечен для обеспечения агента визуализации для диагностики или лечения заболеваний или состояний, связанных с регуляцией уровня IgG.

V. Примеры.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует рассматривать как дополнительное ограничение. Содержание списка последовательностей, фигуры и все ссылки, патенты и опубликованные патентные заявки, которые цитируются в этой заявке, определенно включены в настоящий документ с помощью ссылки.

Пример 1. Влияние Fc-Abdeg на уровень IgG в сыворотке у яванской макаки.

Влияние человеческого IgG-антитела к лизоциму (HEL-Abdeg) и Fc-области человеческого IgG (Fc-Abdeg), содержащей аминокислоты Y, T, E, K, F и Y в EU-положениях 252, 254, 256, 433, 434 и 436 соответственно (Fc-Abdeg; SEQ ID NO: 2), на уровень меченого IgG-антитела в сыворотке определяли у яванской макаки. В частности, яванским макакам вводили 1 мг/кг антитела против мышинового CD70 hIgG1 (FR70-hIgG1, Oshima et al., Int Immunol 10(4): 517-26 (1998)) путем внутривенной болюсной инъекции. Через 5 мин животным вливали либо 7 мг/кг Fc-Abdeg, 20 мг/кг HEL-Abdeg, либо PBS (2 обезьяны на группу). Инфузию проводили в течение 1 ч, и животным вводили объем 10 мл/кг. Образцы крови (3×150

мкл) брали за 5 мин до дозирования ("пре-доза") и через 5 мин, 2, 6, 24, 48, 72, 96 и 120 ч после завершения инфузии. Уровни индикатора определяли, выполняя ИФА mCD70-связывания, и данные наносили на график относительно уровня индикатора в конце дозирования (фиг. 1). Также определяли суммарный уровень IgG у макак (фиг. 2). Результаты этих экспериментов демонстрируют, что Fc-Abdeg уменьшает меченое антитело более эффективно, чем эквивалентные количества HEL-Abdeg.

В дополнение к своей ключевой роли в пути реутилизации IgG FcRn также участвует в гомеостазе альбумина (Chaudhury et al., *J Exp Med.* 197 (3): 315-22 (2003)). FcRn взаимодействует с IgG-Fc и альбумином в различных сайтах, причем связывание может происходить одновременно (Andersen et al., *Nat Commun.* 3:610 (2012)). Понятно, что блокировка рециркуляции IgG с использованием Abdeg-модифицированных молекул не должно мешать взаимодействию альбумина и FcRn. Эта гипотеза была подтверждена в исследовании на мышах *in vivo*, где авторы показали отсутствие влияния Abdeg-несущей молекулы hIgG1 на уровень альбумина (Patel et al., *J Immunol* 187 (2): 1015-22 (2011)). В описанном выше эксперименте уровень альбумина также определяли в день -3, день 3 и день 17 после завершения инфузии. Аналогично исследованию на мышах не наблюдали значительных изменений уровня альбумина после обработки с помощью Fc-Abdeg или HEL-Abdeg (см. фиг. 3).

В последующем эксперименте эффективность Fc-Abdeg в отношении обеднения антител сравнивали с IVIG. В частности, яванским макакам вводили меченое антитело 1 мг/кг (FR70-hIgG1) за 2 дня до введения 70 мг/кг Fc-Abdeg или 2 г/кг IVIG (2 обезьяны на группу). Инфузию Fc-Abdeg и IVIG проводили в течение 4 ч и животным вводили объем 20 мл/кг. Образцы крови (3×150 мкл) брали за 5 мин до введения дозы ("пре-доза") и через 5 мин, 2, 6, 24, 48, 72, 96, 120 и 168 ч после завершения инфузии. Уровни индикатора определяли с помощью ИФА mCD70-связывания и наносили на график относительно уровня пре-дозы (фиг. 4). По сравнению с обработкой IVIG в клинической дозе (2 г/кг) 70 мг/кг Fc-Abdeg показал значительно улучшенную кинетику клиренса индикатора, а также был способен к клиренсу с большей эффективностью (>95% клиренса индикатора за 4 дня для Abdeg против ~75% за 7 дней для IVIG).

Пример 2. Влияние афукозилирования на аффинность Fc-Abdeg к человеческому CD16a и мышинному CD16-2.

Определяли аффинность связывания Fc-Abdeg с hCD16a и сравнивали с афукозилированной формой (Fc-Abdeg-POT). В тот же эксперимент был включен вариант Fc-Abdeg, демонстрирующий улучшенную аффинность для всех FcγR ("Fc-Abdeg-S239D/I332E). В частности, планшет Maxisorp покрывали 100 нг/на лунку нейтравидин биотинсвязывающим белком (ThermoScientific, 31000) и инкубировали в течение ночи при 4°C. На следующий день планшет блокировали PBS+1% казеин течение 2 ч при комнатной температуре. Затем в планшет добавляли 100 мкл/на лунку раствора 250 нг/мл (разведение в PBS+0,1% казеин) биотинилированного hCD16a (Sino Biological Inc., 10389-H27H1-B) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре до применения градиента концентрации молекул Fc-Abdeg или Fc-Abdeg-POT (1 мкМ-0,005 нМ) еще в течение часа. Связывание с hCD16a детектировали с использованием конъюгированного с HRP поликлонального козьего антитела против человеческого Fc (Jackson ImmunoResearch, 109-035-008) (инкубация 1 ч при КТ, разбавление 1/50000 в PBS+0,1% казеин) с последующим добавлением 100 мкл уравновешенного при комнатной температуре ТМВ (SDT-реагенты № ТМВ). Планшеты инкубировали в течение 10 мин перед добавлением 100 мкл 0,5N H₂SO₄ и измерением OD450 нм. Значения EC50 определяли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Результаты этих экспериментов, приведенные на фиг. 5, демонстрируют, что дефукозилирование молекулы Fc-Abdeg приводит к >30-кратному увеличению аффинности к hCD16a (EC50=13 нМ для Fc-Abdeg-POT против EC50>0,4 мкМ для фукозилированного Fc-Abdeg). Как и ожидалось, аффинность связывания варианта Fc-Abdeg-S239D/I332E для hCD16a была увеличена по сравнению с Fc-Abdeg дикого типа (EC50=6 нМ).

Используя аналогичную экспериментальную процедуру, описанную выше, определяли аффинность связывания для мышинного CD16-2 (Sino Biological Inc., 50036-M27H-B). Результаты этих экспериментов, приведенные на фиг. 6, снова демонстрируют повышенную аффинность афукозилированного варианта по сравнению с Fc-Abdeg дикого типа (EC50=11 нМ против EC50>100 нМ). Кратное увеличение аффинности к mCD16-2 варианта Fc-Abdeg-POT по сравнению с Fc-Abdeg дикого типа ниже по сравнению с наблюдаемой аффинностью связывания с человеческим CD16a. Этот эффект не наблюдали для варианта Fc-Abdeg-S239D/I332E (EC50=2нМ), который имеет сходное кратное увеличение аффинности по сравнению с диким типом Fc-Abdeg для обоих, человеческого и мышинного CD16 (EC50=2нМ).

Аутоантитела, образующие комплекс с собственными антигенами, связываются с активирующими FcγR и тем самым вызывают аутоиммунные заболевания, которые частично возникают из-за иммунологически опосредованного воспаления против собственной ткани. Способность Fc-Abdeg антагонизировать взаимодействие аутоиммунных антител и рецепторов FcγRIII на NK-клетках оценивали в двух тестах на основе ADCC.

Первоначально репортерный биоанализ ADCC (Promega, G7016) использовали для анализа конкурентной эффективности связывания hCD16a Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT и Fc-Abdeg-S239D/I332E. Конкретно, 10000 CD20-экспрессирующих клеток Raji (клетки-мишени) инкубировали с 60000 клеток Jurkat,

экспрессирующих hCD16a (эффektorные клетки) в присутствии 100 нг/мл антитела к CD20 и при увеличивающейся концентрации конкурента. Клетки инкубировали в течение 6 ч при 37°C перед измерением сигнала биолюминесценции, что является мерой активности ADCC. Сигнал люциферазы наносили на график по отношению к сигналу, полученному с помощью 100 г/мл антитела к CD20 в отсутствие конкурента (см. фиг. 7). Эти эксперименты демонстрируют, что и Fc-Abdeg-POT, и Fc-Abdeg-S239D/I332E эффективно блокируют сигнал ADCC, индуцированный антителом к CD20, в то время как инкубация с Fc-Abdeg дикого типа не приводит к конкурентному связыванию hCD16a, экспрессируемому на клетках Jurkat.

В следующем анализе ADCC ингибирование литической активности антитела к hCD70 (27B3-hIgG1) с помощью Fc-Abdeg и Fc-Abdeg-POT тестировали как показатель конкурентного связывания hCD16. Конкретно, примерно 50000 hCD70-экспрессирующих клеток U266 пикировали примерно в 300000 свежеччищенных PBMC от здорового донора в присутствии 50 нг/мл антитела против hCD70 и при градиенте концентрации Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT и IVIG. Клетки U266 инкубировали в течение двух дней, и последующий лизис клеток анализировали с помощью FACS с использованием маркера, специфичного для клеток U266 (CD28). Результаты этих экспериментов, представленные на фиг. 8, демонстрируют, что антитело к CD70 эффективно лизирует клетки U266 и что это обеднение клеток может быть ослаблено дозозависимым образом путем добавления Fc-Abdeg-POT, но не Fc-Abdeg дикого типа и не IVIG. Эти данные демонстрируют, что Fc-Abdeg POT обладает улучшенными конкурентными свойствами связывания CD16a относительно Fc-Abdeg дикого типа и IVIG.

Пример 3. Мышиная модель острой ИТР.

Терапевтическую эффективность молекул Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT, Fc-Abdeg-S239D/I332E тестировали на мышиной модели острой иммунной тромбоцитопении. Конкретно, мышей C57BL/6 обрабатывали с помощью IVIG (20 мг/на животное), Fc-Abdeg (1 мг/на животное), Fc-Abdeg-POT (1 мг/на животное), Fc-Abdeg-S239D/I332E (1 мг/на животное) или физиологическим раствором посредством внутрибрюшинной инфузии (5 животных/на группу). Перед обработкой образец крови отбирали для базового измерения количества тромбоцитов. Через час мышей обрабатывали 5 мкг/на животное антителами против мышиных тромбоцитов MWReg30 (Nieswandt et al., Blood 94: 684-93 (1999)). Количество тромбоцитов контролировали в течение 24 ч. Количество тромбоцитов нормализовали относительно исходного количества для каждой мыши и количество тромбоцитов определяли с использованием проточной цитометрии путем окрашивания с антителом к CD61. Результаты этих экспериментов, представленные на фиг. 9, демонстрируют, что предварительная обработка с использованием Fc-Abdeg снижает MWReg30-индуцированную тромбоцитопению с аналогичной эффективностью по сравнению с 7-кратно более высокой молярной дозой IVIG, и, кроме того, что блокада FcγR с помощью Fc-Abdeg POT и Fc-Abdeg-S239D/I332E имела синергетический полезный эффект в этой модели, как видно из повышенного количества тромбоцитов в моменты времени 180 и 1440 мин.

Пример 4. Возможность производства Fc-Abdeg.

Fc-Abdeg (содержащий Fc-домены, имеющие SEQ ID NO: 2), продуцировали в клетках CHO (Evitria, Switzerland) с помощью транзиторной трансфекции. После трансфекции в супернатантах детектировали титр Fc-Abdeg (от 200 до 400 мг/мл). Аналогичный благоприятный профиль продуцирования наблюдали, когда Fc-Abdeg был экспрессирован из экспрессирующего конструкта, стабильно интегрированного в клеточную линию CHO GS-XCEED (Lonza, Great Britain). В среднем стабильные трансфектанты давали 3 г/л, и идентифицировали несколько клонов, которые продуцировали до 6 г/л Fc-Abdeg в 10-литровом биореакторе с мешалкой.

Возможность производства Fc-Abdeg дополнительно исследовали путем анализа агрегатов и продуктов деградации после очистки с использованием протеина А вышеупомянутых продуцированных Fc-Abdeg. Конкретно, 137 мкг Fc-Abdeg загружали на гель-фильтрационную колонку Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare), соединенную с системой хроматографии AktaPurifier. Результаты этого эксперимента, представленные на фиг. 10, продемонстрировали, что наблюдался только очень небольшой процент агрегатов Fc-Abdeg (~0,5%), в то время не детектировали никаких продуктов деградации Fc-Abdeg. Кроме того, применение различных стрессовых условий (замораживание-оттаивание, вращательный или температурный стресс) в отношении очищенного с использованием протеина А Fc-Abdeg не приводило к какому-либо явному изменению физико-химических и функциональных свойств. В совокупности эти данные демонстрируют превосходную возможность производства Fc-Abdeg.

Пример 5. Исследование эскалации дозы Fc-Abdeg у яванских макаков.

Исследование эскалации дозы Fc-Abdeg проводили у яванских макаков, чтобы определить начало проявления фармакодинамического эффекта, а также насыщающую дозу. С этой целью яванским макакам вводили 1 мг/кг антитела против мышиного CD70 hIgG1 (FR70-hIgG1) путем внутривенной болюсной инъекции. Животным вводили через 48 ч различные дозы Fc-Abdeg (0,2, 2, 20 или 200 мг/кг) или носитель (PBS). Инфузию проводили в течение 3 ч и животным вводили объем 36,36 мл/кг. Каждая тестовая группа состояла из 2 животных. Образцы крови (3×150 мкл) отбирали за 5 мин до дозирования ("пре-доза") и через 5 мин, 2, 6, 24, 48, 72 ч, 5, 7, 10 и 14 дней после окончания инфузии. Как уровень меченого IgG (см. фиг. 11), так и эндогенного IgG (см. фиг. 12) определяли с помощью ИФА и строили график относительно уровней пре-дозы. Данные от доз 70 мг/кг накладывали на эксперименты, представленные на фиг. 4 настоящего документа. Дозирование животным 0,2 мг/кг Fc-Abdeg не оказывало

существенного влияния на скорость выведения индикатора и не влияло на эндогенный уровень IgG. Явный фармакодинамический эффект наблюдали при 2 мг/кг, и уровень этого эффекта снижался при дозах от 20 мг/кг. Однократное введение Fc-Abdeg снижает IgG яванских макак максимально на 55% в течение 3-4 дней.

Связывание FcRn ограничено гамма-подтипом иммуноглобулинов и отвечает за их гораздо более длительный период полужизни по сравнению с другими подтипами иммуноглобулинов. Поэтому блокирование функции FcRn по рециркуляции IgG с помощью Fc-Abdeg не должно мешать эндогенному уровню иммуноглобулинов, не относящихся к IgG, что было продемонстрировано путем измерения уровней эндогенных IgA и IgM в образцах сыворотки животных, получавших 200 мг/кг Fc-Abdeg (см. фиг. 13 и 14). Вместе с наблюдением, представленным в примере 1, демонстрирующим, что обработка Fc-Abdeg не влияет на уровень альбумина, эти данные демонстрируют специфический фармакодинамический эффект Fc-Abdeg.

Затем фармакокинетический профиль Fc-Abdeg определяли с помощью ИФА. Fc-Abdeg имеет короткий период полужизни (расчетный период полужизни ~1,5 дня), как было рассчитано по его РК-профилю (см. фиг. 5). На уровнях насыщения не связывающий FcRn Fc-Abdeg будет эффективно выводиться благодаря его собственному способу действия. Кроме того, молекулярный размер Fc-Abdeg близок к пороговому для почечного клиренса (~60 кДа).

Пример 6. Повторное исследование дозирования Fc-Abdeg у яванских макак.

Однократная инфузия Fc-Abdeg в дозе 20 мг/кг снижает уровень эндогенного IgG на 55% у яванских макак примерно через 3-4 дня. В последующем эксперименте было проанализировано, будет ли повторное дозирование Fc-Abdeg еще более снижать этот уровень. Были выполнены две стратегии: одна группа обезьян получала инфузию тестируемого компонента каждые 24 ч в течение первых 4 дней (дни 1, 2, 3, 4), в то время как другая группа получала лекарственное средство каждые четыре дня (дни 1, 5, 9, 13). Для каждого индивидуального введения Fc-Abdeg вводили в дозе 20 мг/кг. Каждая тестовая группа состояла из 2 животных. Процедура инфузии была идентична процедуре, описанной в примере 1. Четкую фармакодинамическую разницу между двумя различными группами наблюдали на 7-й день (см. фиг. 16). Дозирование Fc-Abdeg каждый день в течение первых 4 дней продемонстрировало аналогичное снижение уровня IgG как при однократной инфузии в той же дозе (пунктирная линия, данные примера 1, наложенные в качестве эталона). Дозирование Fc-Abdeg раз в четыре дня приводит к более глубокому и более продолжительному снижению этих уровней. Максимальное снижение до 25% от исходного уровня наблюдали в этой группе обработки.

Определяли фармакокинетический профиль Fc-Abdeg (см. фиг. 7), который соответствовал результатам исследования эскалации дозы, представленного в примере 5.

Пример 7. Дополнительное исследование эскалации дозы Fc-Abdeg у яванских макак.

Последующее исследование эскалации дозы Fc-Abdeg было выполнено на яванских макаках для дополнительного изучения начала и насыщения фармакодинамических эффектов. С этой целью животным вводили различные дозы Fc-Abdeg (10, 30, 50 и 100 мг/кг) или носитель (PBS). Инфузию проводили в течение двух часов, и каждая группа состояла из четырех животных (двух самцов и двух самок). Уровень эндогенного IgG определяли с помощью ИФА и строили график относительно уровня пре-дозы (см. фиг. 18). Промежуточный фармакодинамический эффект наблюдали при дозе 10 мг/кг, и этот эффект выравнивался при дозах от 30 мг/кг. Скорость истощения IgG, начало действия и фармакокинетический профиль (см. фиг. 19, см. табл. 2) были аналогичны результатам, представленным в примере 5.

Таблица 2

Фармакокинетические свойства Fc-Abdeg у яванских макак

Некомпаратментный анализ Fc-Abdeg									
Доза [мг/кг]	С _{max} # [мкг/мл]	t _{max} [ч]	t _{1/2} [ч]	T _{пос- леднее} # [ч]	СЛ [мл/ч/ кг]	ППК _{0- последнее} [мкг*ч/мл]	ППК _{0-∞} [мкг*ч/мл]	ППК _{0-∞} /доза [мкг*ч*кг /мл/мг]	КПД
САМЦЫ									
10	179,1	2	22,8	672	1,95	5138	5138	514	-
30	512,3	2	24,7	672	1,99	15317	15317	511	0,99
50	850,7	2	26,0	672	1,93	26025	26025	521	1,01
100	1414,9	2	28,2	540	2,28	43865	43865	439	0,85
САМКИ									
10	188,3	2	21,3	672	1,80	5573	5573	557	-
30	447,6	2	34,5	672	2,13	14094	14094	470	0,84
50	978,9	2	27,5	456	1,78	28101	28104	562	1,01
100	1586,8	2	28,1	576	2,02	49553	49553	496	0,89

- значения, полученные из сывороточного анализа Fc-Abdeg, все остальные значения рассчитаны с помощью токсикокинетического анализа;

- - невозможно вычислить или нет приемлемого объяснения из имеющихся данных;

КПД - коэффициент пропорциональности дозы=

$[\text{ППК}_{0-\text{последнее}} (x \text{ мг/кг}) / \text{ППК}_{0-\text{последнее}} (10 \text{ мг/кг})] / [(x \text{ мг/кг}) / (10 \text{ мг/кг})]$.

Пример 8. Дополнительное исследование повторного дозирования Fc-Abdeg на яванских макаках.

Последующее исследование повторного дозирования Fc-Abdeg было выполнено на яванских макаках для дополнительного изучения фармакодинамического эффекта при хроническом введении Fc-Abdeg. С этой целью животным вливали каждые 48 ч различные дозы Fc-Abdeg (3, 30 и 100 мг/кг) или носитель (PBS), в общей сложности 15 инфузий. После периода обработки был включен период восстановления, составляющий 30 дней. Каждая группа состояла из четырех животных, за исключением группы 100 мг/кг (которая состояла из трех животных). Уровни эндогенного IgG определяли с помощью ИФА и строили график относительно уровня пре-дозы (см. фиг. 20, среднее \pm SEM). Четкое падение уровня IgG наблюдали для всех тестируемых доз, и этот фармакодинамический эффект сохранялся до конца периода обработки. После периода обработки уровень IgG восстанавливался до исходного уровня в течение 10 дней. Фармакокинетический профиль представлен на фиг. 21.

Пример 9. Исследование хронического дозирования Fc-Abdeg на яванских макаках.

Яванским макакам вливали внутривенно загрузочную дозу 20 мг/кг Fc-Abdeg, и далее они получали ежедневное подкожное введение Fc-Abdeg в количестве 1, 3 или 5 мг/кг, начинающееся через 24 ч после исходной дозы и продолжающееся в течение 12 дней. Каждая тестовая группа состояла из двух животных. Уровень IgG определяли с помощью ИФА и строили график относительно уровня пре-дозы (см. фиг. 22). Данные также представлены для одной яванской макаки из группы введения 3 мг/кг, в которой обработка продолжалась более 12 дней. Этой обезьяне внутривенно вливали загрузочную дозу 20 мг/кг Fc-Abdeg и обезьяне ежедневно подкожно вводили Fc-Abdeg в дозе 3 мг/кг, начиная через 24 ч после начальной дозы и продолжая в течение 28 дней, и продолжая до следующего периода без обработки, составляющего 32 дня (см. фиг. 23). Уровень IgG был снижен до 60% от исходного уровня и оставался неизменно низким на протяжении всего периода обработки. После периода обработки уровень IgG восстанавливался до базового уровня в течение двух недель.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ уменьшения уровня IgG-антитела в сыворотке пациента, включающий введение пациенту эффективного количества выделенного FcRn-антагониста, состоящего из варианта Fc-области IgG1, где Fc-домены варианта Fc-области содержат аминокислоты Y, T, E, K, F и Y в EU положениях 252, 254, 256, 433, 434 и 436 соответственно,

где FcRn-антагонист вводят пациенту по меньшей мере дважды в течение 20 дней,

где FcRn-антагонист вводят внутривенно,

где FcRn-антагонист вводят пациенту в дозе, составляющей 2, 3, 5, 10, 20, 25, 30, 50, 70, 100 или 200 мг/кг, и

где FcRn-антагонист вводят пациенту с частотой, составляющей один раз каждые 7 дней.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что FcRn-антагонист вводят пациенту в дозе, составляющей примерно 10 мг/кг.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что FcRn-антагонист вводят пациенту в дозе, составляющей примерно 20 мг/кг.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что FcRn-антагонист вводят пациенту в дозе, составляющей примерно 25 мг/кг.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность Fc-доменов варианта Fc-области содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность Fc-доменов варианта Fc-области состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что вариант Fc-области имеет повышенную аффинность к CD16a по сравнению с нативной Fc-областью IgG1.

8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что Fc-домены варианта Fc-области не содержат N-связанного гликана в EU-положении 297.

9. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что FcRn-антагонист содержит множество молекул FcRn-антагонистов, где по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 95 или 99% множества молекул FcRn-антагонистов состоят из варианта Fc-области, содержащего афукозилированный N-связанный гликан в EU-положении 297.

10. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что FcRn-антагонист содержит множество молекул FcRn-антагонистов, где по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 95 или 99% множества молекул FcRn-антагонистов состоят из варианта Fc-области, содержащего N-связанный гликан, имеющий дополнительный GlcNac в точке ветвления в EU-положении 297.

11. Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что вариант Fc-области связан с веществом, увеличивающим период полужизни.

12. Способ по любому пп.1-11, отличающийся тем, что вещество, увеличивающее период полужиз-

ни, представляет собой полиэтиленгликоль или человеческий сывороточный альбумин.

13. Способ по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что IgG-антитело представляет собой патогенное антитело.

14. Способ по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что IgG-антитело представляет собой аутоантитело.

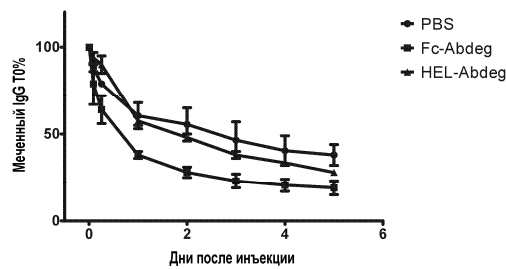
15. Способ по любому из пп.1-14, отличающийся тем, что пациент имеет заболевание или расстройство, опосредованное антителом, и где введение FcRn-антагониста пациенту ослабляет заболевание или расстройство.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что заболевание или расстройство, опосредованное антителом, представляет собой аутоиммунное заболевание.

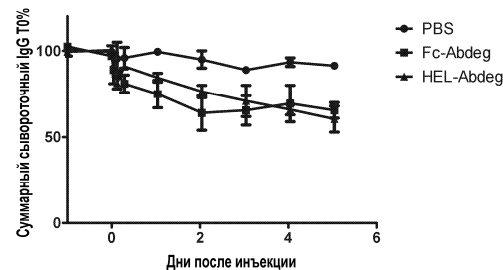
17. Способ по п.16, отличающийся тем, что аутоиммунное заболевание представляет собой аутоиммунную тромбоцитопению или иммунную опосредованную тромбоцитопению.

18. Способ по любому из пп.1-17, отличающийся тем, что FcRn-антагонист вводят пациенту одновременно или последовательно с дополнительным терапевтическим агентом, выбранным из антитела, которое специфично 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, или выбранным из ритуксимаба, даклизумаба, базиликсимаба, муриномаба-CD3, инфликсимаба, адалимумаба, омализумаба, эфализумаба, натализумаба, тоцилизумаба, экулизумаба, голимумаба, канакинумаба, устекинумаба, белиумаба или их комбинации.

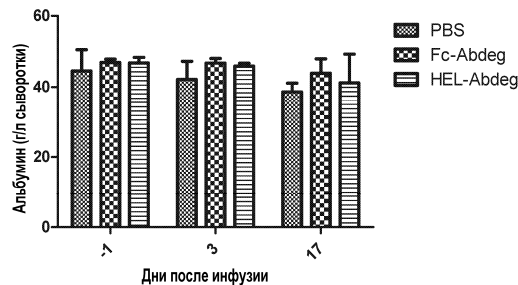
19. Способ по любому из пп.1-18, отличающийся тем, что пациент представляет собой человека или яванскую макаку.



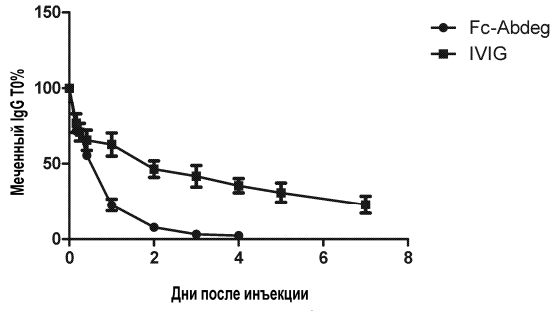
Фиг. 1



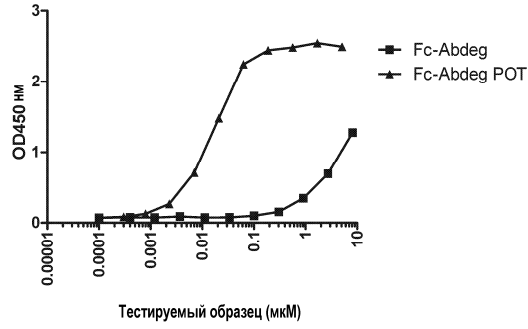
Фиг. 2



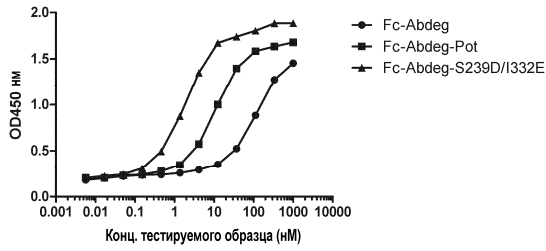
Фиг. 3



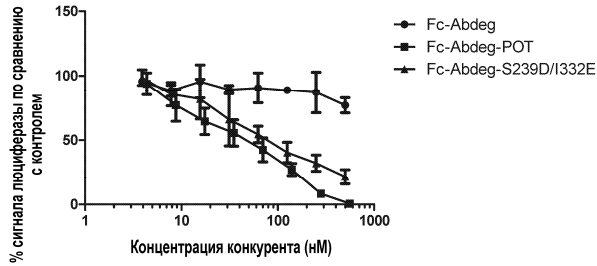
Фиг. 4



Фиг. 5



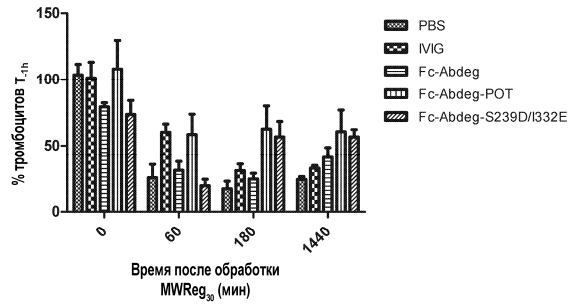
Фиг. 6



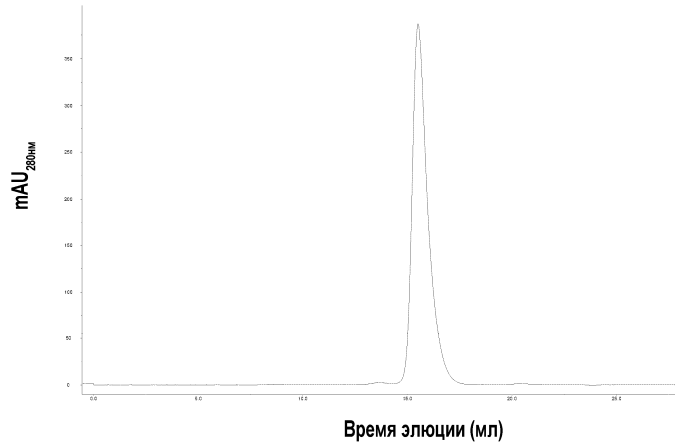
Фиг. 7



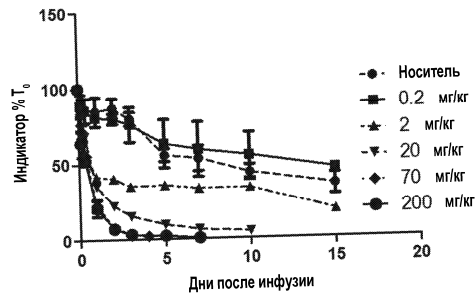
Фиг. 8



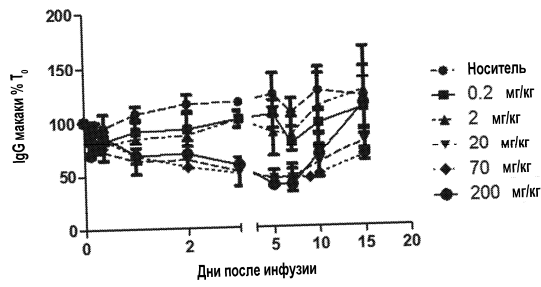
Фиг. 9



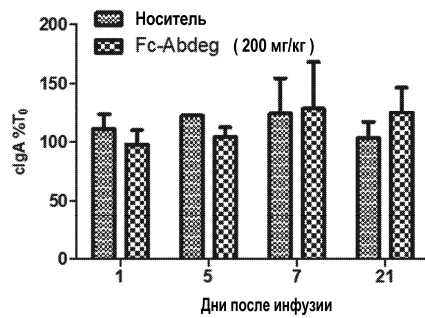
Фиг. 10



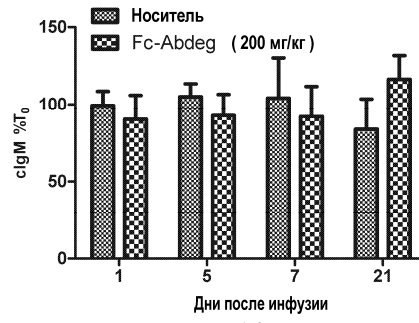
Фиг. 11



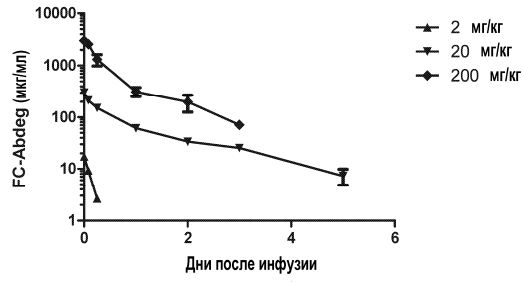
Фиг. 12



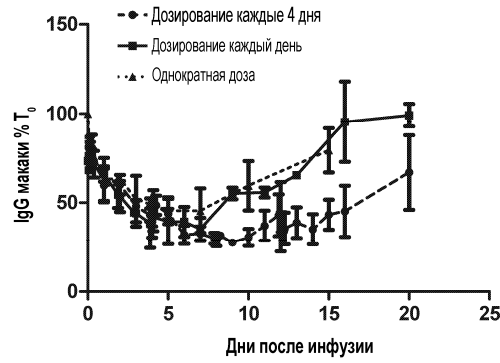
Фиг. 13



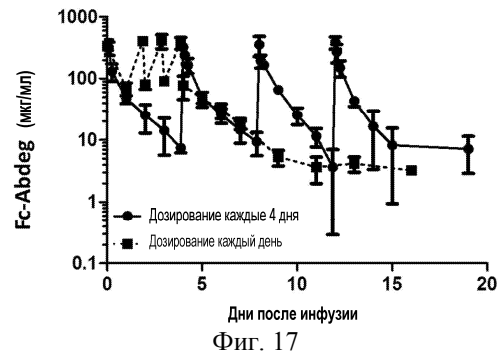
Фиг. 14



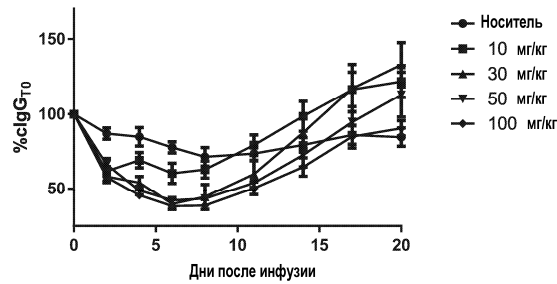
Фиг. 15



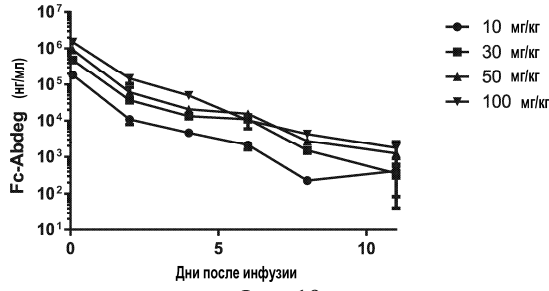
Фиг. 16



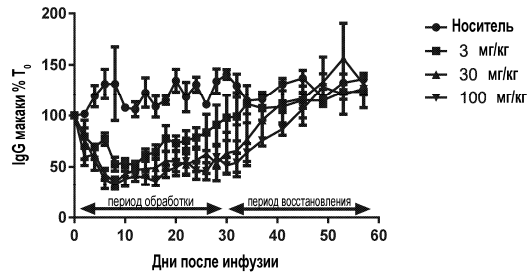
Фиг. 17



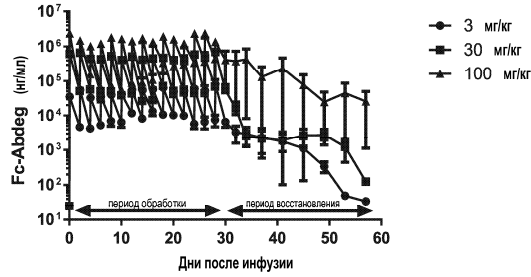
Фиг. 18



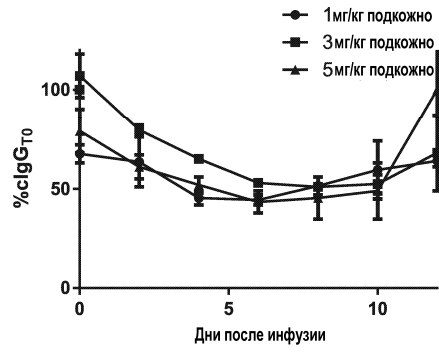
Фиг. 19



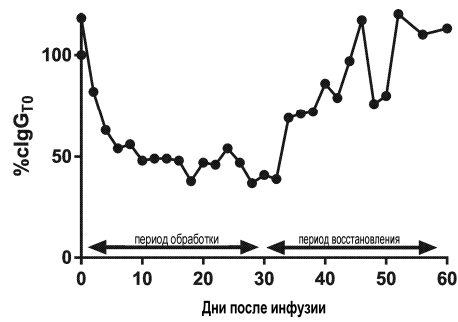
Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23

