

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 682**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2014 PCT/US2014/072087**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.2015 WO15100299**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2014 E 14827372 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3087095**

54 Título: **Antagonistas de FCRN y métodos de uso**

30 Prioridad:

**24.12.2013 US 201361920547 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**17.02.2020**

73 Titular/es:

**ARGENX BVBA (50.0%)  
Industriepark 7  
9052 Zwijnaarde, BE y  
THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY  
OF TEXAS SYSTEM (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ULRICHTS, PETER;  
BLANCHETOT, CHRISTOPHE;  
DREIER, TORSTEN;  
DE HAARD, JOHANNES;  
WARD OBER, E. SALLY y  
ONGENAE, NICOLAS G.H.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 742 682 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Antagonistas de FcRn y métodos de uso

5 **Antecedentes**

Los anticuerpos inmunoglobulinas gamma (IgG) desempeñan un papel clave en la patología de muchos trastornos, como enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias y trastornos en los que la patología se caracteriza por la expresión en exceso de anticuerpos IgG (p. ej., hipergammaglobulinemia) (véase p. ej. Junghans, Immunologic Research 16 (1):29 (1997)).

La semivida de IgG en el suero se prolonga con respecto a la semivida en suero de otras proteínas plasmáticas (Roopenian et al., J. Immunology 170:3528 (2003); Junghans y Anderson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5512 (1996)). Esta larga semivida se debe, en parte, a la unión de la región Fc de IgG al receptor de Fc, FcRn. Aunque el FcRn se caracterizó originalmente como un receptor de transporte neonatal para la IgG materna, también funciona en adultos para proteger la IgG de la degradación. El FcRn se une a la IgG sometida a pinocitosis y protege la IgG del transporte a los lisosomas degradantes reciclandola nuevamente al compartimento extracelular. Este reciclaje se ve facilitado por la unión dependiente del pH de IgG a FcRn, donde la interacción IgG/FcRn es más fuerte al pH ácido endosómico que al pH fisiológico extracelular.

Quando la concentración en suero de IgG alcanza un nivel que excede las moléculas de FcRn disponibles, la IgG no unida no está protegida de los mecanismos degradativos y, en consecuencia, tendrá una semivida sérica reducida. Por lo tanto, la inhibición de la unión de IgG a FcRn reduce la semivida en suero de IgG al prevenir el reciclaje de IgG endosómico de la IgG. Por consiguiente, los agentes que tienen un efecto antagónico sobre la unión de IgG a FcRn pueden ser útiles para regular, tratar o prevenir trastornos mediados por anticuerpos, tales como enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, etc. Un ejemplo de un método que tiene un efecto antagónico sobre la unión de Fc de IgG a FcRn implica la generación de bloqueo de anticuerpos contra FcRn (véase, p. ej., el documento WO2002/43658). También se han identificado péptidos que se unen y tienen un efecto antagónico sobre la función de FcRn (véanse p. ej. Los documentos US6.212.022 y US8.101.186). Además, también se han identificado anticuerpos IgG completos que comprenden receptores Fc variantes con potenciación de la unión a FcRn y disminución de la dependencia del pH que tienen un efecto antagónico sobre la unión de FcRn a IgG (véase, p. ej. El documento US 8.163.881). Sin embargo, existe la necesidad en la técnica de agentes mejorados que tengan un efecto antagónico sobre la unión de FcRn a IgG para su uso en el tratamiento de trastornos mediados por anticuerpos.

El documento WO2013/074598 describe la modificación de la región Fc de un anticuerpo anti-TNF.

**Compendio**

La presente descripción proporciona nuevas composiciones de antagonistas de FcRn. Estas composiciones generalmente comprenden una región Fc variante, o un fragmento de unión a FcRn de la misma, que se une específicamente a FcRn con mayor afinidad y menor dependencia del pH con respecto a la región Fc nativa. La invención se basa, en parte, en el sorprendente hallazgo de que una región Fc variante aislada (p. ej., una región Fc variante que comprende los aminoácidos Y, T, E, K, F e Y en las posiciones EU (numeración UE) 252, 254, 256, 433, 434 y 436 respectivamente) es un antagonista de FcRn más eficaz *in vivo* que un anticuerpo de completo que comprende esa región Fc variante. Las composiciones de antagonistas de FcRn de la presente descripción son particularmente útiles para reducir los niveles en suero de agentes que contienen Fc (p. ej., anticuerpos e inmunoconjugados). En consecuencia, la presente descripción también proporciona métodos para tratar trastornos mediados por anticuerpos (p. ej., enfermedades autoinmunitarias) utilizando las composiciones de antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican las composiciones de antagonistas de FcRn, vectores de expresión recombinantes y células anfitrionas para preparar las composiciones de antagonistas de FcRn y composiciones farmacéuticas que comprenden las composiciones de antagonistas de FcRn.

Los antagonistas de FcRn descritos en la presente memoria son particularmente ventajosos sobre las composiciones de antagonistas de FcRn descritas previamente y los tratamientos conocidos para los trastornos mediados por anticuerpos. Por ejemplo, los antagonistas de FcRn descritos en la presente memoria son más pequeños y más potentes que la gammaglobulina intravenosa (IGIV), el tratamiento actual para muchos trastornos mediados por anticuerpos. Por consiguiente, la dosis eficaz de los antagonistas de FcRn descritos puede ser mucho menor que la de la IVIG. Además, la IVIG se aísla y purifica de donantes humanos y, como consecuencia, sufre una considerable variación de lote a lote. Las composiciones de antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria pueden producirse de forma recombinante o sintetizarse químicamente y, por lo tanto, son mucho más homogéneas. Como se demuestra en la presente memoria, los antagonistas de FcRn descritos en la presente memoria también son sorprendentemente más eficaces que los anticuerpos IgG completos que comprenden receptores de Fc

variantes, como exponen Vaccaro et al., en Nature Biotech 23(9) 1283-1288 (1997).

5 Por consiguiente, en un aspecto, la presente descripción proporciona un antagonista de FcRn aislado que consiste en una región Fc de IgG1 variante o un fragmento de unión a FcRn del mismo, en donde la región Fc o el fragmento de unión a FcRn comprende los aminoácidos Y, T, E, K, F e Y en las posiciones EU 252, 254, 256, 433, 434 y 436 respectivamente, y en donde la región Fc se une a FcRn con mayor afinidad y menor dependencia del pH con respecto a una región Fc de IgG1 de tipo salvaje.

10 El antagonista de FcRn no comprende una región variable de anticuerpo o un dominio CH1. En ciertas realizaciones, el antagonista de FcRn no comprende un residuo de cisteína libre. La región Fc es una región Fc de IgG1 (p. ej., una región Fc de IgG1 humana).

15 En ciertas realizaciones, el antagonista de FcRn consiste en la secuencia de aminoácidos de la región Fc variante expuesta en SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, el antagonista de FcRn consiste en una región Fc variante en donde la secuencia de aminoácidos de los dominios Fc de la región Fc variante consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, 2 o 3. En ciertas realizaciones, el antagonista de FcRn consiste en una región Fc variante en donde la secuencia de aminoácidos de los dominios Fc de la región Fc variante consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2.

20 En ciertas realizaciones, el antagonista de FcRn consiste en una región Fc variante que tiene alteración (aumento o disminución) de la afinidad por un receptor Fc con respecto a la afinidad de una región Fc de IgG1 de tipo salvaje por el receptor gamma Fc. En ciertas realizaciones, la Fc variante tiene mayor afinidad por CD16a.

25 En ciertas realizaciones, el antagonista de FcRn consiste en una región Fc variante que no comprende un glicano ligado a N en la posición EU 297. En ciertas realizaciones, el antagonista de FcRn consiste en una región Fc variante que comprende un glicano ligado a N en la posición EU 297. En ciertas realizaciones, el antagonista de FcRn comprende una región Fc variante que comprende un glicano ligado a N que tiene un GlcNac bisecante en la posición EU 297.

30 En ciertas realizaciones, el antagonista de FcRn comprende una región Fc variante unida a un prolongador de la semivida. En ciertas realizaciones, el prolongador de la semivida es polietilenglicol o albúmina sérica humana. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona una composición de antagonistas de FcRn que comprende una pluralidad de moléculas antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria, en donde al menos 50% (opcionalmente, al menos 60, 70, 80, 90, 95 o 99%) de las moléculas comprenden una región Fc variante, o un fragmento de unión a FcRn de la misma, que tiene un glicano ligado a N afucosilado. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona una composición de antagonistas de FcRn que comprende una pluralidad de moléculas antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria, en donde al menos 50% (opcionalmente, al menos 60, 70, 80, 90, 95 o 99%) de las moléculas comprenden una región Fc variante, o un fragmento de unión a FcRn de la misma, que comprende un glicano ligado a N que tiene un GlcNac bisecante.

40 En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona una composición de antagonistas de FcRn que comprende una pluralidad de moléculas antagonistas de FcRn como se describe en la presente memoria, en donde más de 95% de las moléculas antagonistas de FcRn en la composición son monómeros (p. ej., más de 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9%).

45 En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona una composición de antagonistas de FcRn que comprende una pluralidad de moléculas antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria, en donde menos de 5% de las moléculas antagonistas de FcRn en la composición están presentes en agregados (p. ej., menos de 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1%).

50 En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona una composición de antagonistas de FcRn que comprende una pluralidad de moléculas antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria, en donde la composición está sustancialmente libre de productos de degradación de la molécula antagonista de FcRn.

55 En otro aspecto, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un antagonista de FcRn o una composición de antagonistas de FcRn descrita en la presente memoria y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptables.

60 En la presente memoria se describe un método para inhibir la función de FcRn en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición de antagonistas de FcRn descrita en la presente memoria.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un antagonista de FcRn para uso en la reducción de los niveles en suero de un agente que contiene Fc en un sujeto al que se le ha administrado el agente que contiene Fc. En

ciertas realizaciones, el agente que contiene Fc es un anticuerpo o inmunoadhesina. En ciertas realizaciones, el agente que contiene Fc es un agente terapéutico o de diagnóstico. En ciertas realizaciones, el agente que contiene Fc es un agente de generación de imágenes. En ciertas realizaciones, el agente que contiene Fc es un producto conjugado de fármaco y anticuerpo.

5 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un antagonista de FcRn para su uso en el tratamiento de un trastorno mediado por anticuerpos en un sujeto. En ciertas realizaciones, el trastorno mediado por anticuerpos es la hiperglobulinemia. En ciertas realizaciones, el trastorno mediado por anticuerpos es una enfermedad o trastorno que se puede tratar utilizando inmunoglobulina intravenosa (IGIV). En ciertas realizaciones, el trastorno mediado por anticuerpos es una enfermedad o trastorno que se puede tratar utilizando plasmaféresis y/o inmunoadsorción.

10 En ciertas realizaciones, el trastorno mediado por anticuerpos es una enfermedad autoinmunitaria. En ciertas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en rechazo de injerto de islotes alométricos, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, enfermedad de Alzheimer, autoanticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA), enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, miocarditis autoinmunitaria, neutropenia autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitarias, trombocitopenia autoinmunitaria, urticaria autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, síndrome de Castleman, esprue celíaco con dermatitis, síndrome de disfunción inmunitaria con fatiga crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC), síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, enfermedad de aglutinina fría, enfermedad de Crohn, dermatomiositis, miocardiopatía dilatada, lupus discoide, epidermólisis ampollosa adquirida, crioglobulinemia mixta esencial, deficiencia de factor VIII, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Grave, Guillain-Barré, síndrome de Goodpasture, enfermedad de injerto contra anfitrión (EICA), tiroiditis de Hashimoto, hemofilia A, neuropatía membranosa idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), neuropatía por IgA, polineuropatías por IgM, trombocitopenia inmunomediada, artritis juvenil, enfermedad de Kawasaki, liquen plano, liquen escleroso, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido conectivo, penfigoide de la membrana mucosa, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1, neuropatía motora multifocal (NMM), miastenia gravis, penfigo ampolloso paraneoplásico, penfigoide gestacional, penfigo vulgaris, penfigo foliáceo, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis recidivante, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjorgen, rechazo de trasplante de órganos sólidos, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, necrólisis epidérmica tóxica (NET), síndrome de Stevens Johnson (SSJ), arteritis temporal/arteritis de células gigantes, púrpura trombocitopénica trombótica, colitis ulcerosa, uveítis, dermatitis herpetiforme, vasculitis, vasculitis asociada a anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos, vitiligo y granulomatosis de Wegener.

35 En ciertas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria es una canalopatía autoinmunitaria. En ciertas realizaciones, la canalopatía se selecciona del grupo que consiste en encefalitis límbica autoinmunitaria, epilepsia, neuromielitis óptica, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, miastenia grave, encefalitis del receptor de anti-N-metil-D-aspartato (NMDA), encefalitis asociada al receptor de ácido anti- $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), síndrome de Morvan, neuromiotonía, trastornos neuropsiquiátricos autoinmunitarios pediátricos asociados con infección estreptocócica (PANDAS) y trastorno asociado con el anticuerpo contra el receptor de glicina.

40 En ciertas realizaciones, el antagonista de FcRn se administra al sujeto de forma simultánea o secuencial con un agente terapéutico adicional. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agente antiinflamatorio. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional es rituximab, daclizumab, basiliximab, muronomab-cd3, infliximab, adalimumab, omalizumab, efilizumab, natalizumab, tocilizumab, eculizumab, golimumab, canakinumab, ustekinumab o belimumab. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agente de agotamiento de leucocitos. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agente de agotamiento de células B. En ciertas realizaciones, el agente de agotamiento de células B es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD70, CD72, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85 o CD86.

45 En otro aspecto, la presente descripción proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un antagonista de FcRn descrito en la presente memoria. En otro aspecto, la presente descripción proporciona un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antagonista de FcRn descrito en la presente memoria. En otro aspecto, la presente descripción proporciona una célula anfitriona que comprende un vector de expresión o ácido nucleico que codifica un antagonista de FcRn descrito en la presente memoria. En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para producir un antagonista de FcRn, comprendiendo el método cultivar una célula anfitriona descrita en la presente memoria en condiciones tales que se exprese un antagonista de FcRn.

**Breve descripción de los dibujos**

La FIG. 1 representa los resultados de experimentos para determinar el efecto de Fc-Abdeg y HEL-Abdeg sobre los niveles en suero de un anticuerpo marcador (FR70-hlgG1) en mono cinomolgo.

La FIG. 2 representa los resultados de experimentos para determinar el efecto de Fc-Abdeg y HEL-Abdeg sobre los niveles en suero totales de IgG en monos cinomolgos.

5 La FIG. 3 representa los resultados de los experimentos del efecto de Fc-Abdeg y HEL-Abdeg sobre los niveles de albúmina en monos cinomolgos.

La FIG. 4 representa los resultados de experimentos para determinar el efecto de Fc-Abdeg y IVIG sobre los niveles en suero de un anticuerpo marcador (FR70-hlgG1) en mono cinomolgo.

10 La FIG. 5 representa los resultados de ensayos ELISA que comparan la afinidad de Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT y Fc-Abdeg-S239D/I332E por CD16a humano.

La FIG. 6 representa los resultados de ensayos ELISA que comparan la afinidad de Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT y Fc-Abdeg-S239D/I332E por CD16-2 murino.

15 La FIG. 7 representa los resultados de experimentos para determinar el efecto de Fc-Abdeg, Abdeg-POT y Fc-AbdegS239D/I332E sobre la señal de ADCC inducida por anti-CD20 utilizando el bioensayo de informador ADCC basado en Raji de Promega.

La FIG. 8 representa los resultados de experimentos para determinar el efecto de Fc-Abdeg y Abdeg-POT sobre la lisis inducida por anti-CD70 de células CD70 + U266 *in vitro*

20 La FIG. 9 representa los resultados de experimentos para determinar el efecto de Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT, Fc-Abdeg-S239D/I332E e IVIG sobre los niveles de plaquetas en un modelo murino agudo para trombocitopenia inmunitaria.

La FIG. 10 representa el resultado de una purificación de filtración en gel ilustrativa de Fc-Abdeg.

**Descripción detallada**

25 La presente descripción proporciona nuevas composiciones de antagonistas de FcRn. Estas composiciones generalmente consisten en una región Fc variante, o un fragmento de unión a FcRn de la misma, que se une específicamente a FcRn con mayor afinidad y menor dependencia del pH con respecto a la región Fc nativa. La invención se basa, en parte, en el sorprendente hallazgo de que una región Fc variante aislada (p. ej., una región Fc variante que comprende los aminoácidos Y, T, E, K, F e Y en las posiciones EU 252, 254, 256, 433, 434 y 436 respectivamente) es un antagonista de FcRn más eficaz *in vivo* que un anticuerpo completo que comprende esa región Fc variante. Las composiciones de antagonistas de FcRn de la presente descripción son particularmente útiles para reducir los niveles en suero de agentes que contienen Fc (p. ej., anticuerpos e inmunoadhesinas). En consecuencia, la presente descripción también proporciona métodos para tratar un trastorno mediado por anticuerpos (p. ej., enfermedades autoinmunitarias) utilizando las composiciones de antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican las composiciones de antagonistas de FcRn, vectores de expresión recombinantes y células anfitrionas para preparar las composiciones de antagonistas de FcRn y composiciones farmacéuticas que comprenden las composiciones de antagonistas de FcRn.

**I. Definiciones**

40 A menos que se defina lo contrario en la presente memoria, los términos científicos y técnicos utilizados con respecto a la presente invención tendrán los significados que comúnmente entienden los expertos en la técnica. El significado y el alcance de los términos deben ser claros, sin embargo, en el caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en la presente memoria tienen prioridad sobre cualquier diccionario o definición extrínseca. Adicionalmente, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. En general, la nomenclatura utilizada con respecto a las técnicas de cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descritas en la presente memoria son las bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica.

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, en primer lugar, se definen ciertos términos.

55 Como se emplea en la presente memoria, el término "antagonista de FcRn" se refiere a cualquier agente que comprende una región Fc (p. ej., una región Fc variante descrita en la presente memoria) que se une específicamente a FcRn a través de la región Fc e inhibe la unión de la inmunoglobulina a FcRn, con la condición de que el agente no es un anticuerpo IgG completo.

60 Como se emplea en la presente memoria, el término "región Fc" se refiere a la porción de una inmunoglobulina nativa formada por los dominios Fc de sus dos cadenas pesadas. Una región Fc nativa es homodimérica.

Como se emplea en la presente memoria, el término "región Fc variante" se refiere a una región Fc con una o más alteraciones con respecto a una región Fc nativa. La alteración puede incluir sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos, unión de radicales adicionales y/o alteración de los glicanos nativos. El término abarca regiones Fc

heterodiméricas donde cada uno de los dominios Fc constitutivos es diferente. Los ejemplos de tales regiones Fc heterodiméricas incluyen, sin limitación, regiones Fc preparadas utilizando la tecnología de "ojales y botones" como se describe, por ejemplo, en el documento US 8216805. El término también abarca regiones Fc de cadena sencilla en las que los dominios Fc constitutivos están unidos entre sí por un radical conector, como se describe, por ejemplo, en los documentos US20090252729A1 y US20110081345A1.

Como se emplea en la presente memoria, el término "dominio Fc" se refiere a la porción de una cadena pesada de inmunoglobulina que comienza en la región bisagra inmediatamente aguas arriba del sitio de escisión de papaína y termina en el extremo C-terminal del anticuerpo. Por consiguiente, un dominio Fc completo comprende al menos una porción de un dominio de bisagra (p. ej., región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2 y un dominio CH3.

Como se emplea en la presente memoria, el término "fragmento de unión a FcRn" se refiere a una porción de una región Fc que es suficiente para conferir unión a FcRn.

Como se emplea en la presente memoria, el término "posición EU" se refiere a la posición de aminoácidos en la convención de numeración EU para la región Fc descrita en Edelman, G.M. y col., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969) y Kabat et al, en "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Departamento de Salud y Servicios Humanos del Departamento de EE. UU., 5ª edición, 1991.

Como se emplea en la presente memoria, el término "dominio CH1" se refiere al primer dominio de región constante (el más amino terminal) de una cadena pesada de inmunoglobulina que se extiende desde aproximadamente las posiciones EU 118-215. El dominio CH1 es adyacente al dominio VH y al extremo amino terminal de la región bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina, y no forma parte de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina.

Como se emplea en la presente memoria, el término "región bisagra" se refiere a la porción de una molécula de cadena pesada que conecta el dominio CH1 al dominio CH2. Esta región de bisagra comprende aproximadamente 25 residuos y es flexible, permitiendo así que las dos regiones de unión al antígeno N-terminales se muevan independientemente. Las regiones bisagra se pueden subdividir en tres dominios distintos: dominios bisagra superior, medio e inferior (Roux y col. J. Immunol. 161: 4083 (1998)). Los antagonistas de FcRn de la presente descripción pueden incluir toda o una parte de una región bisagra.

Como se emplea en la presente memoria, el término "dominio CH2" se refiere a la porción de una molécula de inmunoglobulina de cadena pesada que se extiende desde aproximadamente las posiciones EU 231-340,

Como se emplea en la presente memoria, el término "dominio CH3" incluye la porción de una molécula de inmunoglobulina de cadena pesada que se extiende aproximadamente 110 residuos desde el extremo N del dominio CH2, por ejemplo, desde aproximadamente la posición 341-446 (sistema de numeración EU).

Como se emplea en la presente memoria, el término "FcRn" se refiere a un receptor de Fc neonatal. Las moléculas de FcRn ilustrativas incluyen FcRn humano codificado por el gen FCGRT como se establece en RefSeq NM\_004107.

Como se emplea en la presente memoria, el término "CD16" se refiere a los receptores de Fc FcγRIII que se requieren para la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Las moléculas CD16 ilustrativas incluyen CD16a humano como se establece en RefSeq NM\_000569,

Como se emplea en la presente memoria, el término "cisteína libre" se refiere a un residuo de aminoácido de cisteína nativo o modificado genéticamente que existe en una forma sustancialmente reducida en un antagonista de FcRn maduro.

Como se emplea en la presente memoria, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de las mismas (p. ej., IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio (CL). Las regiones VH y VL se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR).

Como se emplea en la presente memoria, el término "glicano ligado a N" se refiere al glicano ligado a N anclado al nitrógeno (N) en la cadena lateral de asparragina en el secuéon (es decir, la secuencia Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, donde

X es cualquier aminoácido excepto prolina) presente en el dominio CH2 de una región Fc. Tales N-glicanos son descritos completamente, por ejemplo, por Drickamer K, Taylor ME (2006). Introduction to Glycobiology, 2ª ed.

5 Como se emplea en la presente memoria, el término "afucosilado" se refiere a un glicano ligado a N que carece de una molécula de fucosa central como se describe en el documento US8067232.

10 Como se emplea en la presente memoria, el término "GlcNac bisecante" se refiere a un glicano ligado a N que tiene una molécula de N-acetilglucosamina (GlcNac) unida a una molécula de manosa central, como se describe en el documento US8021856.

15 Como se emplea en la presente memoria, el término "trastorno mediado por anticuerpos" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno causado o exacerbado por la presencia de un anticuerpo en un sujeto.

20 Como se emplea en la presente memoria, el término "agente que contiene Fc" es cualquier molécula que comprende una región Fc.

25 Como se emplea en la presente memoria, el término "agente de agotamiento de leucocitos" se refiere a un agente que reduce el número de leucocitos en un sujeto tras su administración.

30 Como se emplea en la presente memoria, el término "agente de agotamiento de células B" se refiere a un agente que reduce el número de células B en un sujeto tras su administración.

35 Como se emplea en la presente memoria, el término "agente de agotamiento de células T" se refiere a un agente que reduce el número de células T en un sujeto tras su administración.

40 Como se emplea en la presente memoria, el término "canalopatía autoinmunitaria" se refiere a enfermedades causadas por autoanticuerpos contra una subunidad del canal iónico o una molécula que regula el canal.

45 Como se emplea en la presente memoria, el término "tratar", "tratando" y "tratamiento" se refieren a medidas terapéuticas o preventivas descritas en la presente memoria. Los métodos de "tratamiento" emplean la administración a un sujeto, de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, por ejemplo, un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno asociado con IL-6 (p. ej., inflamación y cáncer) o predispuesto a tener tal enfermedad o trastorno, para prevenir, curar, retrasar, reducir la gravedad o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno o enfermedad o trastorno recurrente, o para prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de tal tratamiento. Como se emplea en la presente memoria, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano.

50 Como se emplea en la presente memoria, el término "inmunoadhesina" se refiere a una molécula similar a un anticuerpo, que comprende un dominio funcional de una proteína de unión (p. ej., un receptor, ligando o molécula de adhesión celular) con una región Fc.

## II. Antagonistas de FcRn

55 En un aspecto, la invención proporciona nuevas composiciones de antagonistas de FcRn. En general, estas composiciones consisten en una región Fc variante, o un fragmento de unión a FcRn de la misma, que se une específicamente a FcRn con mayor afinidad y menor dependencia del pH con respecto a una región Fc nativa. Estos antagonistas de FcRn inhiben la unión de agentes que contienen Fc (p. ej., anticuerpos e inmunoadhesinas) a FcRn *in vivo*, lo que da como resultado una mayor tasa de degradación de los agentes que contienen Fc y, concomitantemente, un menor nivel en suero de estos agentes.

60 La presente memoria descriptiva describe, por primera vez, que una región Fc variante aislada (p. ej., una región Fc variante que comprende los aminoácidos Y, T, E, K, F e Y en las posiciones EU 252, 254, 256, 433, 434 y 436 respectivamente) es un antagonista de FcRn más eficaz *in vivo* que un anticuerpo completo que comprende la misma región Fc variante. Por consiguiente, las composiciones de antagonistas de FcRn no son anticuerpos completos. Las composiciones de antagonistas de FcRn no comprenden un dominio variable de anticuerpo. Las composiciones de antagonistas de FcRn no comprenden un dominio variable de anticuerpo o un dominio CH1.

65 Cualquier región Fc se puede alterar para producir una región Fc variante para su uso en las composiciones de antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria. En general, una región Fc, o un fragmento de unión a FcRn de la misma, es de una inmunoglobulina humana. Sin embargo, se entiende que la región Fc se puede obtener de una inmunoglobulina de cualquier otra especie de mamífero, que incluye, por ejemplo, una especie de camélido, un roedor (p. ej., un ratón, rata, conejo, cobaya) o una especie de primate no humano (chimpancé, macaco). La región Fc es una región Fc de IgG1 (p. ej., una región de IgG1 humana). Una variedad de secuencias de genes de la región Fc (p. ej., secuencias de genes de la región constante humana) están disponibles en forma de depósitos de acceso

público. Se apreciará que el alcance de esta invención abarca alelos, variantes y mutaciones de regiones Fc.

Una región Fc se puede truncar adicionalmente o eliminar internamente para producir un fragmento de unión a FcRn mínimo de la misma. La capacidad de un fragmento de la región Fc para unirse a FcRn se puede determinar utilizando cualquier ensayo de unión reconocido en la técnica, p. ej., ELISA.

Para mejorar la capacidad de fabricación de los antagonistas de FcRn descritos en la presente memoria, es preferible que las regiones Fc constitutivas no comprendan residuos de cisteína no unidos por disulfuro. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, las regiones Fc no comprenden un residuo de cisteína libre.

Se puede utilizar cualquier variante de Fc, o fragmento de unión a FcRn de la misma, que se une específicamente a FcRn con mayor afinidad y menor dependencia del pH con respecto a la región Fc nativa en las composiciones de antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria. En ciertas realizaciones, la región Fc variante comprende alteraciones, sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos que confieren las características deseadas. En ciertas realizaciones, la región o fragmento Fc variante comprende los aminoácidos Y, T, E, K, F e Y en las posiciones EU 252, 254, 256, 433, 434 y 436, respectivamente. Los ejemplos no limitantes de secuencias de aminoácidos que se pueden utilizar en las regiones Fc variantes se exponen en la Tabla 1, en la presente memoria. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de los dominios Fc de la región Fc variante consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de los dominios Fc de la región Fc variante consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, 2 o 3. En ciertas realizaciones, un antagonista de FcRn consiste en una región Fc variante, en donde la secuencia de aminoácidos de los dominios Fc de la región Fc variante consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, 2 o 3.

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de ejemplos no limitantes de regiones Fc variantes

| SEQ ID NO  | Secuencia de aminoácidos   |
|--|--|
| 1  | CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL <u>YITRE</u> PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT<br>ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN   |
|  | YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEAL <u>KF</u> HYTQKLSLSLSP<br>G  |
| 2  | DKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL <u>YITRE</u> PEVTCVVVDVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA<br>PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEAL <u>KF</u> HYTQKS<br>LSLSPGK |
| 3  | DKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL <u>YITRE</u> PEVTCVVVDVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA<br>PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEAL <u>KF</u> HYTQKS<br>LSLSPG  |
| Los aminoácidos en las posiciones EU 252, 254, 256, 433 y 434 están subrayados |  |

En ciertas realizaciones, la región Fc variante tiene una alteración de la afinidad de unión (p. ej., aumento o disminución) por un receptor de Fc adicional. La región Fc variante puede tener una alteración de la afinidad de unión (p. ej., aumento o disminución) por uno o más de los receptores de Fcγ, por ejemplo, FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIB (CD32), FcγRIIA (CD16a) y FcγRIIB (CD16b). Se puede emplear cualquier medio reconocido en la técnica para alterar la afinidad por un receptor Fc adicional. En ciertas realizaciones, se altera la secuencia de aminoácidos de la región Fc variante.

En ciertas realizaciones, la región Fc variante comprende un residuo de aminoácido no natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 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 y 334 según la numeración del índice EU como establece Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender un residuo de aminoácido de origen no natural en posiciones adicionales y/o alternativas conocidas por un experto en la técnica (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.624.821; 6.277.375; 6.737.056; las Publicaciones de Patente PCT WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752 y WO 05/040217, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad).

En ciertas realizaciones, la región Fc variante comprende al menos un residuo de aminoácido no natural seleccionado del grupo que consiste en 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235E, 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, y 332A según la numeración del índice EU como establece Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender residuos de aminoácidos no naturales adicionales y/o alternativos conocidos por un experto en la técnica (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.624.821; 6.277.375; 6.737.056; las Publicaciones de Patentes PCT WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752 y WO 05/040217).

Otras variantes de Fc conocidas que se pueden utilizar en los antagonistas de FcRn descritos en la presente memoria incluyen, sin limitaciones, las descritas por Ghetie et al., 1997, en *Nat. Biotech.* 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); las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.624.821; 5.885.573; 5.677.425; 6.165.745; 6.277.375; 5.869.046; 6.121.022; 5.624.821; 5.648.260; 6.528.624; 6.194.551; 6.737.056; 6.821.505; 6.277.375; la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2004/0002587 y las Publicaciones PCT Núm. WO 94/29351; WO 99/58572; WO 00/42072; WO 02/06919; WO 04/029207; WO 04/099249; WO 04/063351.

En ciertas realizaciones, la región Fc variante es un heterodímero, donde los dominios Fc constitutivos son diferentes entre sí. Los métodos para producir heterodímeros de Fc son conocidos en la técnica (véase, p. ej., el documento US 8216805, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad). En ciertas realizaciones, la región Fc variante es una región Fc de cadena sencilla, donde los dominios Fc constitutivos están unidos entre sí por un radical conector. Los métodos para producir regiones Fc de cadena sencilla son conocidos en la técnica (véanse, p. ej., los documentos US20090252729A1 y US20110081345A1).

Se cree que los anticuerpos IgG patogénicos observados en las enfermedades autoinmunitarias son los desencadenantes patogénicos de estas enfermedades o contribuyen a la progresión de la enfermedad y median la enfermedad a través de la activación inapropiada de los receptores celulares de Fc. Los autoanticuerpos agregados y/o autoanticuerpos complejados con autoantígenos (complejos inmunitarios) se unen a los receptores de Fc activadores, causando numerosas enfermedades autoinmunitarias (que se producen en parte debido a la inflamación mediada inmunológicamente contra los propios tejidos) (véanse, Clarkson et al., *NEJM* 314 (9), 1236-1239 (2013)); el documento US20040010124A1; el documento US20040047862A1; y el documento US2004/0265321A1). En consecuencia, para tratar los trastornos mediados por anticuerpos (p. ej., enfermedades autoinmunitarias), sería ventajoso eliminar los autoanticuerpos nocivos y bloquear la interacción de los complejos inmunitarios de estos anticuerpos con los receptores Fc activadores (p. ej., receptores de Fcγ, tales como CD16a).

Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la región Fc variante del antagonista de FcRn exhibe una mayor unión a CD16a (p. ej., CD16a humano). Esto es particularmente ventajoso ya que permite que el antagonista de FcRn tenga un efecto antagónico adicional de la respuesta inflamatoria inducida por el complejo inmunitario de los autoanticuerpos que está siendo elegido como diana para la eliminación mediante la inhibición de FcRn. Se puede emplear cualquier medio reconocido en la técnica para aumentar la afinidad por CD16a (p. ej., CD16a humano). En ciertas realizaciones, el antagonista de FcRn comprende una región Fc variante que comprende un glicano ligado a N (p. ej., en la posición EU 297). En este caso, es posible aumentar la afinidad de unión del antagonista de FcRn por

CD16a alterando la estructura del glicano. Las alteraciones del glicano ligado a N de las regiones Fc son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se ha demostrado que los glicanos ligados a N ó N-glicanos que tienen una estructura GlcNac bisecante presentan una mayor afinidad por CD16a. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, el glicano ligado a N está afucosilado. La afucosilación se puede lograr utilizando cualquier medio reconocido en la técnica. Por ejemplo, se puede expresar un antagonista de FcRn en células que carecen de fucosil transferasa, de modo que no se añade fucosa al glicano ligado a N en la posición EU 297 de la región Fc variante (véase, p. ej., el documento US 8.067.232). En ciertas realizaciones, el glicano ligado a N tiene una estructura GlcNac bisecante. La estructura GlcNac bisecante puede lograr utilizando cualquier medio reconocido en la técnica. Por ejemplo, un antagonista de FcRn se puede expresar en células que expresan beta 1-4-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), de modo que se añade GlcNac bisecante al glicano ligado a N en la posición EU 297 de la región Fc variante (véase, p. ej., el documento US 8021856). Adicionalmente o alternativamente, las alteraciones de la estructura de los glicanos ligados a N también se pueden lograr por medios enzimáticos *in vitro*.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona composiciones de antagonistas de FcRn en las que una porción de las moléculas antagonistas de FcRn contenidas en las mismas comprenden estructuras de glicano alteradas. En ciertas realizaciones, la composición de antagonistas de FcRn comprende una pluralidad de moléculas antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria, en donde al menos el 50% (opcionalmente, al menos 60, 70, 80, 90, 95 o 99%) de las moléculas comprenden una región Fc o fragmento de unión a FcRn de la misma que tiene un glicano ligado a N afucosilado. En ciertas realizaciones, la composición de antagonistas de FcRn que comprende una pluralidad de moléculas antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria, en donde al menos 50% (opcionalmente, al menos 60, 70, 80, 90, 95 o 99%) de las moléculas comprenden una región Fc o fragmento de unión a FcRn de la misma que comprende un glicano ligado a N que tiene una GlcNac bisecante.

En ciertas realizaciones, la región Fc variante no comprende un glicano ligado a N. Esto se puede lograr utilizando cualquier método reconocido en la técnica. Por ejemplo, la variante Fc puede expresarse en una célula que es incapaz de glicosilación ligada a N. De manera adicional o alternativa, la secuencia de aminoácidos de la variante Fc se puede alterar para prevenir o inhibir la glicosilación ligada a N (p. ej., por mutación del secunón NXT). Alternativamente, la variante Fc puede ser sintetizado en un sistema acelular (p. ej., sintetizado químicamente).

En ciertas realizaciones, las moléculas antagonistas de FcRn se pueden modificar, por ejemplo, mediante la unión covalente de una molécula (p. ej., un radical de unión o de formación de imágenes) al antagonista de FcRn de modo que la unión covalente no impida que el antagonista de FcRn se una específicamente a FcRn. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, el antagonista de FcRn se puede modificar mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos bloqueadores protectores conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc.

En ciertas realizaciones, el antagonista de FcRn comprende una región Fc variante unida a un prolongador de la semivida. Como se emplea en la presente memoria, el término "prolongador de la semivida" se refiere a cualquier molécula que, cuando se une a un antagonista de FcRn descrito en la presente memoria, aumenta la semivida de un antagonista de FcRn. Cualquier prolongador de la semivida puede estar unido (covalentemente o no covalentemente) al antagonista de FcRn. En ciertas realizaciones, el prolongador de la semivida es polietilenglicol o albúmina sérica humana. En ciertas realizaciones, el antagonista de FcRn está unido a una molécula de unión que se une específicamente a un prolongador de la semivida presente en un sujeto, tal como una molécula o célula transportada por la sangre, tal como albúmina de suero (p. ej., albúmina sérica humana), IgG, eritrocitos, etc.

Los antagonistas de FcRn descritos en la presente memoria tienen una excelente capacidad de fabricación. Por ejemplo, como se muestra en el Ejemplo 5 en la presente memoria, se pueden expresar a altos niveles en células de mamífero (p. ej., a 6 g/L en células CHO en un biorreactor de tanque agitado de 10 L). Además, después de la purificación de la proteína A, la composición de antagonistas de FcRn purificada resultante tiene un porcentaje muy alto de monómeros antagonistas de FcRn y contiene un nivel extremadamente bajo de agregados de proteínas antagonistas y productos de degradación de FcRn. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona una composición de antagonistas de FcRn que comprende una pluralidad de moléculas antagonistas de FcRn como se describe en la presente memoria, en donde más de 95% de las moléculas antagonistas de FcRn en la composición son monómeros (p. ej., más de 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9%). En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona una composición de antagonistas de FcRn que comprende una pluralidad de moléculas antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria, en donde menos del 5% de las moléculas antagonistas de FcRn en la composición están presentes en agregados (p. ej., menos de 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1%). En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona una composición de antagonistas de FcRn que comprende una pluralidad de moléculas antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria, en donde la composición está sustancialmente libre de productos de degradación de la molécula antagonista de FcRn.

### III. Usos de los antagonistas de FcRn

Las composiciones de antagonistas de FcRn de la presente descripción son particularmente útiles para reducir los niveles en suero de agentes que contienen Fc (p. ej., anticuerpos e inmuno adhesinas). Por consiguiente, en un aspecto, la presente descripción proporciona una composición de antagonistas de FcRn (p. ej., una composición farmacéutica) descrita en la presente memoria para su uso en la inhibición de la función de FcRn en un sujeto.

La reducción de los niveles en suero de agentes que contienen Fc (p. ej., anticuerpos e inmuno adhesinas) es particularmente aplicable al tratamiento de trastornos mediados por anticuerpos (p. ej., enfermedades autoinmunitarias). Por consiguiente, en un aspecto, la presente descripción proporciona las composiciones de antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria para su uso en el tratamiento de trastornos mediados por anticuerpos (p. ej., enfermedades autoinmunitarias).

Cualquier trastorno mediado por anticuerpos puede ser tratado utilizando las composiciones de antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria. En ciertas realizaciones, el trastorno mediado por anticuerpos es uno que es susceptible de tratamiento por IVIG. En ciertas realizaciones, el trastorno mediado por anticuerpos es una enfermedad autoinmunitaria. Las enfermedades autoinmunitarias no limitantes incluyen el rechazo de injerto de islotes alogénicos, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, enfermedad de Alzheimer, autoanticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA), enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, miocarditis autoinmunitaria, neutropenia autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitarias, trombocitopenia autoinmunitaria, urticaria autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, síndrome de Castleman, esprue celíaco con dermatitis, síndrome de disfunción inmunitaria con fatiga crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC), síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, enfermedad de aglutinina fría, enfermedad de Crohn, dermatomiositis, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, deficiencia de factor VIII, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Grave, Guillain-Barré, síndrome de Goodpasture, enfermedad de injerto contra anfitrión (EICA), tiroiditis de Hashimoto, hemofilia A, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), neuropatía por IgA, polineuropatías por IgM, trombocitopenia inmunomediada, artritis juvenil, enfermedad de Kawasaki, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1, neuropatía motora multifocal (NMM), miastenia gravis, pénfigo ampolloso paraneoplásico, pénfigo vulgaris, pénfigo foliáceo, anemia perniciososa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndrome poliglandular, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjorgen, rechazo de trasplante de órganos sólidos, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, necrólisis epidérmica tóxica (NET), síndrome de Stevens Johnson (SSJ), arteritis temporal/arteritis de células gigantes, púrpura trombocitopénica trombótica, colitis ulcerosa, uveítis, dermatitis herpetiforme, vasculitis, vasculitis asociada a anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos, vitiligo y granulomatosis de Wegener.

En ciertas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria es una canalopatía autoinmunitaria. Las canalopatías no limitantes incluyen neuromielitis óptica, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, miastenia gravis, encefalitis del receptor de anti-N-metil-D-aspartato (NMDA), encefalitis asociada al receptor de ácido anti- $\alpha$ -Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-proxaiónico (AMPA), síndrome de Morvan y trastorno asociado con el anticuerpo del receptor de glicina.

Las composiciones de antagonistas de FcRn de la presente descripción son particularmente adecuadas para tratar trastornos mediados por anticuerpos caracterizados por una producción excesiva de inmunoglobulina sérica. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, las composiciones de antagonistas de FcRn se utilizan para tratar la hipergammaglobulinemia.

Las composiciones de antagonistas de FcRn también se pueden utilizar combinadas con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agente antiinflamatorio. Se puede utilizar cualquier agente inflamatorio combinado con las composiciones descritas en la presente memoria. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico es rituximab, daclizumab, basiliximab, muronomab-cd3, infliximab, adalimumab, omalizumab, efalizumab, natalizumab, tocilizumab, eculizumab, golimumab, canakinumab, ustekinumab o belimumab. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional es el agente de agotamiento de leucocitos (p. ej., agente de agotamiento de células B o células T). Se puede utilizar cualquier agente de agotamiento de leucocitos combinado con las composiciones de antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria. En ciertas realizaciones, el agente de agotamiento de leucocitos es un agente de agotamiento de células B. En ciertas realizaciones, el agente de agotamiento de leucocitos es un anticuerpo contra un marcador de superficie celular. Los marcadores de superficie celular adecuados incluyen, sin limitación, CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD70, CD72, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85 o CD86. El antagonista de FcRn y el agente o los agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar al sujeto de forma simultánea o secuencial, a través de la misma o diferentes vías de administración.

Las composiciones de antagonistas de FcRn de la presente descripción también son adecuadas para reducir

rápida los niveles en suero de un agente que contiene Fc en el sujeto. Tal eliminación rápida es ventajosa en los casos en que el agente que contiene Fc es tóxico (p. ej., un producto conjugado de anticuerpo-fármaco o un agente que sea inmunogénico) ya que reduce la exposición del sujeto al fármaco. La eliminación rápida también es ventajosa en los casos en que el agente que contiene Fc es un agente de imagen que requiere un nivel sérico bajo del agente para facilitar la generación de imágenes. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, las composiciones de antagonistas de FcRn se utilizan para reducir los niveles en suero de un agente que contiene Fc en un sujeto al que se le ha administrado el agente que contiene Fc. Los niveles en suero de cualquier agente que contenga Fc (p. ej., agente terapéutico o de diagnóstico) se pueden reducir utilizando las composiciones de antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria. Los ejemplos no limitantes de agentes que contienen Fc incluyen agentes de generación de imágenes (p. ej., anticuerpos marcados), productos conjugados de fármacos con anticuerpos o agentes inmunogénicos (p. ej., anticuerpos o inmunoadhesinas no humanos). El antagonista de FcRn se puede administrar simultáneamente con el agente que contiene Fc o secuencialmente (p. ej., antes o después del agente que contiene Fc).

Además, en enfermedades o afecciones que requieren la administración de un agente terapéutico, el sujeto a menudo desarrollará anticuerpos (p. ej., anticuerpos antifármaco) contra el agente terapéutico, que, a su vez, evitan que el agente terapéutico esté disponible para su propósito terapéutico previsto o causan una reacción adversa en el sujeto. Por consiguiente, las composiciones de antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria también se pueden utilizar para eliminar anticuerpos (p. ej., anticuerpos antifármaco) contra el agente terapéutico que se desarrolla en un sujeto.

Las composiciones de antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria también se pueden utilizar combinadas con la proteína terapéutica para mejorar el beneficio de la proteína terapéutica reduciendo los niveles de IgG; en donde, los anticuerpos IgG son responsables de la disminución de la biodisponibilidad de una proteína terapéutica. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para tratar un trastorno resultante de una respuesta inmunitaria a un factor de coagulación que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de antagonistas de FcRn descrita en la presente memoria. Los factores de coagulación adecuados incluyen, sin limitación, fibrinógeno, protrombina, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII o factor de von Willebrand. Este método se puede utilizar para regular o tratar, o prevenir una respuesta inmunitaria a un factor de coagulación en un paciente que sufre, por ejemplo, de hemofilia A o hemofilia B. En ciertas realizaciones, el método se puede utilizar para regular o tratar una respuesta inmunitaria a, por ejemplo, eritropoyetina terapéutica en un paciente que padece aplasia pura de glóbulos rojos (PRCA).

El FcRn es responsable de transportar anticuerpos maternos a través de la placenta hasta el feto en una mujer embarazada. En consecuencia, si a una mujer embarazada se le administra un agente que contiene Fc (p. ej., un anticuerpo terapéutico), el agente puede entrar en contacto con el feto como resultado del transporte mediado por FcRn a través de la placenta. Para evitar cualquier efecto nocivo potencial del agente que contiene Fc en el desarrollo fetal, sería ventajoso bloquear la función de FcRn. Por consiguiente, la presente descripción proporciona un método para prevenir la transferencia placentaria de un agente que contiene Fc (p. ej., un anticuerpo terapéutico) al feto en una mujer embarazada, comprendiendo el método administrar a la mujer las composiciones de antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria, ya sea simultáneamente o secuencialmente (antes o después) con el agente que contiene Fc.

Las composiciones de antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria también se pueden utilizar para tratar trastornos inflamatorios que incluyen, pero no se limitan a, asma, alergia asociada a colitis ulcerosa y síndrome inflamatorio intestinal, que incluyen rinitis/sinusitis alérgicas, alergias cutáneas (urticaria/urticaria, angioedema, dermatitis atópica), alergias alimentarias, alergias a medicamentos, alergias a insectos, mastocitosis, artritis, que incluye osteoartritis, artritis reumatoide y espondiloartropatías.

La implementación satisfactoria de la terapia génica para el tratamiento de una enfermedad o afección puede verse obstaculizada por el desarrollo de anticuerpos específicos para la proteína terapéutica codificada por el transgen, así como posiblemente para el vector utilizado para administrar el transgen. Por consiguiente, las composiciones de antagonistas de FcRn descritas en la presente memoria se pueden administrar combinadas con terapia génica para mejorar el beneficio de la proteína terapéutica codificada mediante la reducción de los niveles de IgG. Estos métodos son particularmente útiles en situaciones en las que los anticuerpos IgG son responsables de la disminución de la biodisponibilidad de un vector de terapia génica o la proteína terapéutica codificada. El vector de terapia génica puede ser, p. ej., un vector viral tal como adenovirus y virus adenoasociado. Las enfermedades que se pueden tratar con terapia génica incluyen, entre otras, fibrosis quística, hemofilia, PRCA, distrofia muscular o enfermedades de almacenamiento lisosómico, como, por ejemplo, la enfermedad de Gaucher y la enfermedad de Fabry.

Un experto en la técnica podría, mediante experimentación de rutina, determinar qué cantidad eficaz y no tóxica de composición de antagonistas de FcRn tendría el propósito de tratar un trastorno mediado por anticuerpos. Por

ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de un polipéptido puede variar según factores tales como el estadio de la enfermedad (p. ej., estadio I versus estadio IV), la edad, el sexo, las complicaciones médicas (p. ej., afecciones o enfermedades inmunodeprimidas) y el peso del sujeto, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el sujeto. El régimen de dosificación se puede ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas diariamente, o la dosis se puede reducir proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Generalmente, sin embargo, se espera que una dosis eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 10.000 mg/kg de peso corporal por día, por ejemplo, aproximadamente 1 a 1000, aproximadamente 10-500, o aproximadamente 50-250 mg/kg de peso corporal por día (p. ej., aproximadamente 70 mg/kg de peso corporal por día).

#### IV. Composiciones Farmacéuticas

En otro aspecto, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un antagonista de FcRn o una composición de antagonistas de FcRn descrita en la presente memoria y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences por E. W. Martin. Los ejemplos de excipientes pueden incluir almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol, y similares. La composición también puede contener reactivos tamponadores de pH y agentes humectantes o emulsionantes.

La composición farmacéutica se puede formular para administración parenteral (p. ej., intravenosa o intramuscular) mediante inyección en embolada. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y contienen agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua libre de pirógenos.

Los antagonistas de FcRn se pueden ligar a quelantes tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.326.856. El complejo de péptido-quelante se puede radiomarcarse para proporcionar un agente de generación de imágenes para el diagnóstico o tratamiento de enfermedades o afecciones que impliquen la regulación de los niveles de IgG.

#### V. Producción de antagonistas de FcRn

En un aspecto, la invención proporciona polinucleótidos, vectores y células anfitrionas que codifican los antagonistas de FcRn descritos en la presente memoria. También se proporcionan métodos para fabricar antagonistas de FcRn que comprenden expresar estos polinucleótidos.

Los polinucleótidos que codifican los antagonistas de FcRn descritos en la presente memoria se insertan típicamente en un vector de expresión para su introducción en células anfitrionas que se pueden utilizar para producir la cantidad deseada de los antagonistas de FcRn reivindicados. Por consiguiente, en ciertos aspectos, la invención proporciona vectores de expresión que comprenden polinucleótidos descritos en la presente memoria y células anfitrionas que comprenden estos vectores y polinucleótidos.

El término "vector" o "vector de expresión" se utiliza en la presente memoria para los fines de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, para referirse a vectores utilizados de acuerdo con la presente invención como un vehículo para introducir y expresar un gen deseado en una célula. Como saben los expertos en la técnica, tales vectores se pueden seleccionar fácilmente del grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la presente invención comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción apropiados para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad de entrar y/o replicarse en células eucariotas o procariotas.

Se pueden emplear numerosos sistemas de vectores de expresión para los fines de esta invención. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de ADN, que se obtienen de virus animales tales como virus del papiloma bovino, virus del polioma, adenovirus, virus vaccinia, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistronicos con sitios internos de unión a ribosomas. Además, las células que han integrado el ADN en sus cromosomas se pueden seleccionar mediante la introducción de uno o más marcadores que permiten la selección de células anfitrionas transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofia a un anfitrión auxótrofo, resistencia a biocidas (p. ej., antibióticos) o resistencia a metales pesados tales como el cobre. El gen marcador seleccionable puede unirse directamente a las secuencias de ADN que se van a expresar o introducir en la misma célula por co-transformación. También se pueden necesitar elementos adicionales para una síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias señal, señales de corte y empalme, así como promotores transcripcionales, potenciadores y señales de terminación.

Más generalmente, una vez que se ha preparado un vector o secuencia de ADN que codifica un antagonista de FcRn, el vector de expresión se puede introducir en una célula anfitriona apropiada. Es decir, las células anfitrionas se pueden transformar. La introducción del plásmido en la célula anfitriona se puede lograr mediante diversos mecanismos bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, transfección (incluyendo electroforesis y electroporación), fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio, fusión celular con ADN envuelto, microinyección e infección con virus intacto. Véase, Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Capítulo 24.2, pág. 470-472 Vectores, Rodríguez y Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Massachusetts, 1988). Lo más preferiblemente, la introducción de plásmidos en el anfitrión se realiza por electroporación. Las células transformadas se cultivan en condiciones apropiadas para la producción del antagonista de FcRn, y se analizan para determinar la expresión del antagonista de FcRn. Las técnicas de ensayo ilustrativas incluyen ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

Como se emplea en la presente memoria, el término "transformación" se utilizará en un sentido amplio para referirse a la introducción de ADN en una célula anfitriona receptora que cambia el genotipo y, en consecuencia, da como resultado un cambio en la célula receptora.

En esa misma línea, "células anfitrionas" se refiere a células que se han transformado con vectores construidos utilizando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo. En las descripciones de procedimientos para el aislamiento de polipéptidos de anfitriones recombinantes, los términos "célula" y "cultivo celular" se utilizan indistintamente para indicar la fuente del antagonista de FcRn a menos que se especifique claramente lo contrario. En otras palabras, la recuperación del antagonista de FcRn de las "células" puede significar ya sea a partir de células completas sometidas a centrifugación o a partir del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

En una realización, la línea celular anfitriona utilizada para la expresión del antagonista de FcRn es de origen mamífero; los expertos en la técnica pueden determinar líneas celulares anfitrionas particulares, que son las más adecuadas para el producto génico deseado que se expresará en las mismas. Las líneas de células anfitrionas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, DG44 y DUXB11 (líneas de Ovario de Hámster Chino, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno T de SV40), R1610 (fibroblastos de hámster chino) BALBC/3T3 (fibroblastos de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano), 293 (riñón humano). En una realización, la línea celular proporciona alteración de la glicosilación, por ejemplo, afucosilación, del antagonista de FcRn expresado a partir de la misma (p. ej., PER.C6.RTM. (Crucell) o líneas celulares CHO con el gen FUT8 desactivado (células Potelligent™) (Biowa, Princeton, N.J.)). En una realización, se pueden utilizar células NS0. Las células CHO son particularmente preferidas. Las líneas celulares anfitrionas están típicamente disponibles en los servicios comerciales, la American Tissue Culture Collection o en la bibliografía publicada.

La producción *in vitro* permite la ampliación para proporcionar grandes cantidades del antagonista de FcRn deseado. Las técnicas para el cultivo de células de mamífero en condiciones de cultivo de tejidos son conocidas en la técnica e incluyen el cultivo en suspensión homogéneo, p. ej. en un reactor agitado por aire o en un reactor con agitación continua, o en cultivo celular inmovilizado o atrapado, p. ej. en fibras huecas, microcápsulas, microesferas de agarosa o cartuchos cerámicos. Si fuera necesario y/o deseado, las soluciones de polipéptidos pueden purificarse mediante los métodos de cromatografía habituales, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa y/o cromatografía de (inmuno) afinidad.

Los genes que codifican los antagonistas de FcRn de la invención también se pueden expresar en células que no sean de mamífero tales como bacterias o células de levadura o plantas. A este respecto, se apreciará que también se pueden transformar diversos microorganismos unicelulares que no sean de mamífero tales como bacterias; es decir, aquellos capaces de crecer en cultivos o fermentación. Las bacterias, que son susceptibles de transformación, incluyen miembros de las enterobacterias, tales como las cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; *Bacillaceae*, tales como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* y *Haemophilus influenzae*. Se apreciará adicionalmente que, cuando se expresan en bacterias, los antagonistas de FcRn pueden formar parte de cuerpos de inclusión. Los antagonistas de FcRn se deben aislar, purificar y a continuación ensamblar en moléculas funcionales. Además de los procariontes, también se pueden utilizar microbios eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura panadera común, es el más comúnmente utilizado entre los microorganismos eucarióticos, aunque una serie de otras cepas están comúnmente disponibles.

Además de los sistemas de expresión basados en células, los antagonistas de FcRn también se pueden producir utilizando métodos acelulares o químicamente sintéticos. En ciertas realizaciones, los antagonistas de FcRn son producidos por síntesis química *in vitro*.

#### IV. Ejemplificación

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

##### Ejemplo 1: Efecto de Fc-Abdeg sobre los niveles de IgG en suero en monos cinomolgos

5 Se determinó el efecto de una IgG anti-lisozima humana (HEL-Abdeg) y una región Fc de IgG humana (Fc-Abdeg), que comprende los aminoácidos Y, T, E, K, F e Y en las posiciones EU 252, 254, 256, 433, 434 y 436, respectivamente (Fc-Abdeg; SEQ ID NO: 2), sobre los niveles de IgG en suero de un anticuerpo marcador en monos cinomolgos. Específicamente, a los monos cinomolgos se les administró 1 mg/kg de un anticuerpo trazador hIgG1 anti-CD70 murino (FR70-hIgG1; Oshima et al., *Int Immunol* 10 (4): 517-26 (1998)) mediante inyección en embolada i.v. Los animales fueron infundidos 5 minutos más tarde con 7 mg/kg de Fc-Abdeg, 20 mg/kg de HEL-Abdeg o PBS (2 monos por grupo). La infusión se realizó en el plazo de 1 hora y a los animales se les administró un volumen de 10 ml/kg. Se tomaron muestras de sangre (3x 150 µl) 5 minutos antes de la dosificación ("predosis") y 5 minutos, 2 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h y 120 h después de completar la infusión. Los niveles del marcador se determinaron realizando un ELISA de unión a mCD70 y los datos se trazaron con respecto a los niveles del marcador al final de la dosificación (FIG. 1). También se determinaron los niveles totales de IgG de cinomolgo (FIG. 2). Los resultados de estos experimentos muestran que Fc-Abdeg redujo el anticuerpo marcador de manera más eficaz que las cantidades equimolares de HEL-Abdeg.

Además de su papel clave en la vía de recuperación de IgG, FcRn también participa en la homeostasis de la albúmina (Chaudhury et al., *J Exp Med.* 197 (3):315-22 (2003)). FcRn interactúa con Fc de IgG y albúmina en distintos sitios y la unión puede ocurrir simultáneamente (Andersen y col., *Nat Commun.* 3:610 (2012)). Conceptualmente, el bloqueo del reciclaje de IgG utilizando moléculas modificadas con Abdeg no debería interferir con la interacción albúmina-FcRn. Esta hipótesis fue confirmada en un estudio *in vivo* en ratón, donde los autores no mostraron influencia de una molécula de hIgG1 equipada con Abdeg sobre los niveles de albúmina (Patel et al., *J Immunol* 187(2): 1015-22 (2011)). En el experimento descrito anteriormente, los niveles de albúmina también se determinaron el día -3, día 3 y día 17 después de la finalización de la infusión. De forma análoga al estudio con ratones, no se observaron cambios significativos en los niveles de albúmina después del tratamiento con Fc-Abdeg o HEL-Abdeg (véase la FIG. 3).

En un experimento posterior, la potencia de Fc-Abdeg que agota los anticuerpos se comparó con la IVIG. Específicamente, a los monos cinomolgos se les administró 1 mg/kg de anticuerpo marcador (FR70-hIgG1) 2 días antes de la dosificación con 70 mg/kg de Fc-Abdeg o 2 g/kg de IVIG (2 monos por grupo). La infusión de Fc-Abdeg y IVIG se realizó en el plazo de 4 horas y se administró a los animales un volumen de 20 ml/kg. Se tomaron muestras de sangre (3x 150 µl) 5 minutos antes de la dosificación ("predosis") y 5 minutos, 2 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h y 168 h después de completar la infusión. Los niveles de trazadores se determinaron mediante ELISA de unión a mCD70 y se representaron gráficamente con respecto a los niveles pre-dosis (FIG. 4). En comparación con el tratamiento con IGIV a dosis clínica (2 g/kg), 70 mg/kg de Fc-Abdeg mostraron una cinética significativamente mejorada de la eliminación del marcador y también fue capaz de eliminar de manera más eficaz (> 95% de eliminación del marcador en el plazo de 4 días para Abdeg frente a ~75% en 7 días para IVIG).

##### Ejemplo 2: Efecto de la afucosilación sobre la afinidad de Fc-Abdeg por CD16a humano y CD16-2 murino

Se determinó la afinidad de unión de Fc-Abdeg por hCD16a y se comparó con la forma afucosilada (Fc-Abdeg-POT). En el mismo experimento, se incluyó una variante de Fc-Abdeg que mostraba una mayor afinidad por todos los FcγR ("Fc-Abdeg-S239D/I332E). Específicamente, una placa Maxisorp se revistió con 100 ng/pocillo de proteína de unión a Biotina Neutravidina (ThermoScientific, 31000) y se incubó durante la noche a 4°C. Al día siguiente, la placa se bloqueó con PBS + caseína al 1% de durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron a la placa 100 µl/pocillo de una solución de 250 ng/ml (dilución en PBS + caseína al 0,1%) de hCD16a biotilado (Sino Biological Inc., 10389-H27H1-B) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente antes de aplicar un gradiente de concentración de moléculas de Fc-Abdeg o Fc-Abdeg-POT (1 µM - 0,005 nM) durante una hora más. Se detectó la unión a hCD16a utilizando un anticuerpo policlonal de cabra anti-Fc humano conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch, 109-035-008) (incubación 1 hora a temperatura ambiente, dilución 1/50.000 en PBS + caseína al 0,1%), seguido de la adición de 100 µl de TMB equilibrado a temperatura ambiente (SDT-reactivos #s TMB). Las placas se incubaron durante 10 minutos antes de la adición de 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5N y la medición de DO450 nm. Los valores de CE<sub>50</sub> se determinaron utilizando el soporte lógico GraphPad Prism. Los resultados de estos experimentos, expuestos en la FIG. 5, muestran que la defucosilación de la molécula de Fc-Abdeg produce un aumento >30 veces de la afinidad por hCD16a (CE<sub>50</sub>= 13 nM para el Fc-Abdeg-POT vs. CE<sub>50</sub> > 0,4 µM para el Fc-Abdeg fucosilado). Como se esperaba, la afinidad de unión de la variante Fc-Abdeg-S239D/I332E para hCD16a aumentó en comparación con la Fc-Abdeg de tipo salvaje (EC<sub>50</sub> = 6 nM).

Utilizando un procedimiento experimental similar al descrito anteriormente, se determinó la afinidad de unión por CD16-2 murino (Sino Biological Inc., 50036-M27H-B). Los resultados de estos experimentos, expuestos en la FIG. 6, muestran nuevamente una mayor afinidad de la variante afucosilada en comparación con el Fc-Abdeg de tipo salvaje (CE<sub>50</sub>= 11 nM vs. CE<sub>50</sub> > 100 nM). El aumento de la afinidad por mCD16-2 de la variante Fc-Abdeg-POT sobre el Fc-Abdeg de tipo salvaje es menor en comparación con el observado para la unión a CD16a humano. Este

efecto no se observó para la variante Fc-Abdeg-S239D/I332E ( $CE_{50} = 2 \text{ nM}$ ), que tiene un aumento similar de la afinidad sobre Fc-Abdeg de tipo salvaje para el CD16 tanto humano como murino ( $CE_{50} = 2 \text{ nM}$ ).

Los autoanticuerpos complejados con autoantígenos se unen para activar los Fc $\gamma$ R y, por lo tanto, desencadenan las enfermedades autoinmunitarias, que se producen en parte debido a la inflamación mediada inmunológicamente contra el propio tejido. La capacidad de Fc-Abdeg para suscitar antagonismo de la interacción de anticuerpos autoinmunitarios y los receptores Fc $\gamma$ RIII en células NK se evaluó en dos ensayos basados en ADCC.

Inicialmente, se usó un bioensayo informador ADCC (Promega, G7016) para analizar la potencia de unión competitiva a hCD16a de Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT y Fc-Abdeg-S239D/I332E. Específicamente, se incubaron 10.000 células Raji que expresaban CD20 (células diana) con 60.000 células Jurkat que expresan hCD16a (células efectoras) en presencia de 100 ng/ml de anticuerpo anti-CD20 y una concentración creciente de competidor. Las células se incubaron durante 6 horas a 37°C antes de medir la señal de bioluminiscencia, que es una medida de la actividad de ADCC. La señal de luciferasa se trazó con respecto a la señal obtenida por 100 ng/ml de anti-CD20 en ausencia de competidor (véase la FIG.f7). Estos experimentos demuestran que tanto Fc-Abdeg-POT como Fc-Abdeg-S239D/I332E bloquean eficazmente la señal de ADCC inducida por anti-CD20, mientras que la incubación con Fc-Abdeg de tipo salvaje no conduce a una unión competitiva para hCD16a expresada en células Jurkat.

En un siguiente ensayo de ADCC, se probó la inhibición de la actividad lítica de un anticuerpo anti-hCD70 (27B3-hlgG1) por Fc-Abdeg y Fc-Abdeg-POT como una medida de la unión competitiva de hCD16. Específicamente, se añadieron aproximadamente 50.000 células que expresaban hCD70 en aproximadamente 300.000 PBMC recién purificadas de un donante sano en presencia de 50 ng/ml del anticuerpo anti-hCD70 y un gradiente de concentración de Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT y IVIG. Las células U266 se incubaron durante dos días, y la posterior lisis celular se analizó mediante FACS utilizando un marcador específico para las células U266 (CD28). Los resultados de estos experimentos, establecidos en la FIG. 8, muestran que el anticuerpo anti-CD70 lisa eficazmente las células U266 y que este agotamiento podría atenuarse de una manera dependiente de la dosis mediante la adición de Fc-Abdeg-POT, pero no mediante la adición de Fc-Abdeg de tipo salvaje ni de IVIG. Estos datos demuestran que Fc-Abdeg POT tiene mejores propiedades competitivas de unión a CD16a con respecto a Fc-Abdeg de tipo salvaje e IVIG.

### Ejemplo 3: Modelo ITP agudo murino

La potencia terapéutica de las moléculas Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT, Fc-Abdeg-S239D/I332E se probó en un modelo de ratón de trombocitopenia inmunitaria aguda. Específicamente, se trataron ratones C57BL/6 con IVIG (20 mg/animal), Fc-Abdeg (1 mg/animal), Fc-Abdeg-POT (1 mg/animal), Fc-Abdeg-S239D/I332E (1 mg/animal) o solución salina a través de la infusión intraperitoneal (5 animales/grupo). Antes del tratamiento, se extrajo una muestra de sangre para una medición de referencia de los recuentos de plaquetas. Una hora después, los ratones fueron tratados con 5  $\mu$ g/animal del anticuerpo anti-plaquetas de ratón MWReg30 (Nieswandt et al., Blood 94: 684-93 (1999)). Los recuentos de plaquetas se verificaron durante 24 horas. Los recuentos de plaquetas se normalizaron con respecto a los recuentos iniciales para cada ratón y se determinaron los números de plaquetas utilizando citometría de flujo mediante tinción anti-CD61. Los resultados de estos experimentos, establecidos en la FIG. 9, demuestran que el pretratamiento con Fc-Abdeg reduce la trombocitopenia inducida por MWReg30 con una potencia similar en comparación con una dosis molar 7 veces mayor de IVIG y, adicionalmente, ese bloqueo de Fc $\gamma$ R por Fc-Abdeg POT y Fc-Abdeg-S239D/I332E tuvo un efecto beneficioso sinérgico en este modelo, como lo demuestran los recuentos de plaquetas mejorados en los puntos de tiempo de 180 y 1440 minutos.

### Ejemplo 4: Capacidad de fabricación de Fc-Abdeg

Se produjo Fc-Abdeg (que comprende dominios Fc que tienen SEC ID NO: 2) en células CHO (Evitria, Suiza) mediante transfección transitoria. Después de la transfección, se detectaron títulos altos de Fc-Abdeg en los sobrenadantes (entre 200 y 400 mg/ml). Se observó un perfil de producción favorable similar cuando Fc-Abdeg se expresó a partir de una construcción de expresión integrada de forma estable en la línea celular CHO GS-XCEED (Lonza, Gran Bretaña). De promedio, los transfectantes estables produjeron 3 g/L y se identificaron varios clones que produjeron hasta 6 g/L de Fc-Abdeg en un biorreactor de tanque agitado de 10 L.

La capacidad de fabricación del Fc-Abdeg se investigó más a fondo mediante el análisis de agregados y productos de degradación después de la purificación de proteína A de los ciclos de producción de Fc-Abdeg mencionados anteriormente. Específicamente, se cargaron 137  $\mu$ g de Fc-Abdeg en una columna de filtración en gel Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) acoplada a un sistema de cromatografía ÄktaPurifier. Los resultados de este experimento, expuestos en la FIG. 10, mostraron que solo se observó un porcentaje muy pequeño de agregados de Fc-Abdeg (~0,5%), mientras que no se detectaron productos de degradación de Fc-Abdeg. Además, la aplicación de diversas condiciones de estrés (estrés de congelación-descongelación, de rotación o de temperatura) al Fc-Abdeg purificado con proteína A no condujo a ningún cambio aparente en las propiedades fisicoquímicas y funcionales. Tomados en conjunto, estos datos demuestran la excelente capacidad de fabricación del Fc-Abdeg.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un antagonista de FcRn aislado que consiste en una región Fc de IgG1 variante, o un fragmento de unión a FcRn del mismo, en donde los dominios Fc de la región Fc o el fragmento de unión a FcRn del mismo comprenden los aminoácidos Y, T, E, K, F y Y en las posiciones EU 252, 254, 256, 433, 434 y 436 respectivamente, y en donde la región Fc se une a FcRn con mayor afinidad y menor dependencia del pH con respecto a una región Fc de IgG1 de tipo salvaje.
- 10 2. El antagonista de FcRn aislado de la reivindicación 1, en donde la región Fc tiene una mayor afinidad por un receptor Fc gamma con respecto a la afinidad de una región Fc de IgG1 de tipo salvaje por el receptor Fc gamma.
- 15 3. Un antagonista de FcRn aislado que consiste en una región Fc de IgG1 variante, en donde la secuencia de aminoácidos de los dominios Fc de la región Fc variante consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, 2 o 3.
- 20 4. El antagonista de FcRn aislado de la reivindicación 3, en donde la secuencia de aminoácidos de los dominios Fc de la región Fc variante consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1.
- 25 5. El antagonista de FcRn aislado de la reivindicación 3, en donde la secuencia de aminoácidos de los dominios Fc de la región Fc variante consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2.
- 30 6. El antagonista de FcRn aislado de la reivindicación 3, en donde la secuencia de aminoácidos de los dominios Fc de la región Fc variante consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3.
- 35 7. El antagonista de FcRn aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el antagonista de FcRn no comprende un residuo de cisteína libre.
- 40 8. El antagonista de FcRn aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la región Fc variante tiene una mayor incrementada por CD16a.
- 45 9. El antagonista de FcRn aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde los dominios Fc de la región Fc variante no comprenden un glicano ligado a N en la posición 297 EU, o en donde los dominios Fc de la región Fc variante comprenden un dominio Fc que tiene un glicano ligado a N afucosilado en la posición EU 297, o en donde los dominios Fc de la región Fc variante comprenden un glicano ligado a N que tiene un GlcNac bisecante en la posición EU 297 de los dominios Fc.
- 50 10. El antagonista de FcRn aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la región Fc variante está unida a un prolongador de la semivida, o unida a una molécula de unión que se une específicamente a un prolongador de la semivida presente en un sujeto.
- 55 11. El antagonista de FcRn aislado de la reivindicación 10, en donde el prolongador de la semivida es polietilenglicol o albúmina sérica humana.
- 60 12. El antagonista de FcRn aislado de la reivindicación 10, en donde el prolongador de la semivida es una molécula de unión que se une específicamente a albúmina sérica humana.
13. Una composición de antagonistas de FcRn que comprende una pluralidad de moléculas antagonistas de FcRn de la reivindicación 9, en donde al menos 50% (opcionalmente, al menos 60, 70, 80, 90, 95 o 99%) de las moléculas comprenden una región Fc variante, o un fragmento de unión a FcRn de la misma, que comprende un glicano ligado a N afucosilado, o en donde al menos 50% (opcionalmente, al menos 60, 70, 80, 90, 95 o 99%) de las moléculas comprenden una región Fc variante o fragmento de unión a FcRn de la misma, que comprende un glicano ligado a N que tiene un GlcNac bisecante.
14. Una composición farmacéutica que comprende la composición de antagonistas de FcRn o antagonista de FcRn de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptables.
15. Un antagonista de FcRn o composición de antagonistas de FcRn de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para su uso en la reducción de los niveles en suero de un agente que contiene Fc en un sujeto al que se le ha administrado el agente que contiene Fc, en donde dicho antagonista de FcRn o composición de antagonistas de FcRn se administra simultánea o secuencialmente a dicho sujeto.
16. Un antagonista de FcRn o composición de antagonistas de FcRn para usar de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el agente que contiene Fc es un anticuerpo o inmunoadhesina, o en donde el agente que contiene Fc es un agente terapéutico o de diagnóstico, o en donde el agente que contiene Fc es un agente de generación de

imágenes, o en donde el agente que contiene Fc es un producto conjugado de fármaco de anticuerpo.

17. Un antagonista de FcRn o composición de antagonistas de FcRn de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para uso en el tratamiento de un trastorno mediado por anticuerpos en un sujeto.

18. Un antagonista de FcRn o composición de antagonistas de FcRn para su uso según la reivindicación 17, en donde el trastorno mediado por anticuerpos es una enfermedad autoinmunitaria, opcionalmente en donde la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en rechazo de injerto de islotes allogénicos, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípidos, enfermedad de Addison autoinmunitaria, enfermedad de Alzheimer, autoanticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA), enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, miocarditis autoinmunitaria, neutropenia autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitarias, trombocitopenia autoinmunitaria, urticaria enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, síndrome de Castleman, esprue celíaco con dermatitis, síndrome de disfunción inmunitaria con fatiga crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC), síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, enfermedad de aglutinina fría, enfermedad de Crohn, dermatomiositis, cardiomiopatía dilatada, lupus discoide, epidermólisis ampollosa adquirida, crioglobulinemia mixta esencial, deficiencia de factor VIII, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Grave, Guillain-Barré, síndrome de Goodpasture, enfermedad de injerto contra anfitrión (GVHD), tiroiditis de Hashimoto, hemofilia A, neuropatía membranosa idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), neuropatía por IgA, polineuropatías por IgM, trombocitopenia inmunomediada, artritis juvenil, enfermedad de Kawasaki, liquen plano, liquen escleroso, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido conectivo, penfigoide de la membrana mucosa, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1, neuropatía motora multifocal (NMM), miastenia gravis, penfigoide ampolloso paraneoplásico, penfigoide gestacional, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndrome poliglandular, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, policondritis recidivante, fenómeno de Reynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjorgen, rechazo de trasplante de órganos sólidos, síndrome de hombre rígido, lupus sistémico, arteritis de Takayasu, necrosis epidérmica tóxica (NET), síndrome de Stevens Johnson (SSJ), arteritis temporal/arteritis de células gigantes, púrpura trombocitopénica trombótica, colitis ulcerosa, uveítis, dermatitis herpetiforme, vasculitis, vasculitis asociada a anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos, vitiligo y granulomatosis de Wegener.

19. Un antagonista de FcRn o composición de antagonistas de FcRn para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el trastorno mediado por anticuerpos se puede tratar utilizando inmunoglobulina intravenosa (IVIG), plasmaféresis y/o inmunoadsorción.

20. Un antagonista de FcRn o composición de antagonistas de FcRn para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, en donde la enfermedad autoinmunitaria es una canalopatía autoinmunitaria, opcionalmente en la que la canalopatía se selecciona del grupo que consiste en encefalitis límbica autoinmunitaria, epilepsia, neuromielitis óptica, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, miastenia gravis, encefalitis relacionada con el receptor anti-N-metil-D-aspartato (NMDA), encefalitis relacionada con el receptor de ácido anti- $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), síndrome de Morvan, neuromiotonía, trastornos neuropsiquiátricos autoinmunitarios pediátricos asociados con infección estreptocócica (PANDAS) y trastorno asociado a anticuerpos contra el receptor de glicina.

21. Un antagonista de FcRn o composición de antagonistas de FcRn para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el trastorno mediado por anticuerpos es hiperglobulinemia.

22. Un antagonista de FcRn o composición de antagonistas de FcRn para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el antagonista de FcRn se administra al sujeto de forma simultánea o secuencial con un agente terapéutico adicional, opcionalmente un agente antiinflamatorio o un agente de agotamiento de leucocitos.

23. Un antagonista de FcRn o composición de antagonistas de FcRn para su uso de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el agente de agotamiento de leucocitos es un agente de agotamiento de células B, opcionalmente un anticuerpo, opcionalmente en donde el anticuerpo se une específicamente a CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD70, CD72, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85 o CD86.

24. Un antagonista de FcRn o composición de antagonistas de FcRn para su uso de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el agente terapéutico adicional es rituximab, daclizumab, basiliximab, muronomab-CD3, infliximab, adalimumab, omalizumab, efalizumab, natalizumab, tocilizumab, eculizumab, golimumab, canakinumab, ustekinumab, belimumab, o una combinación de los mismos.

FIG.1

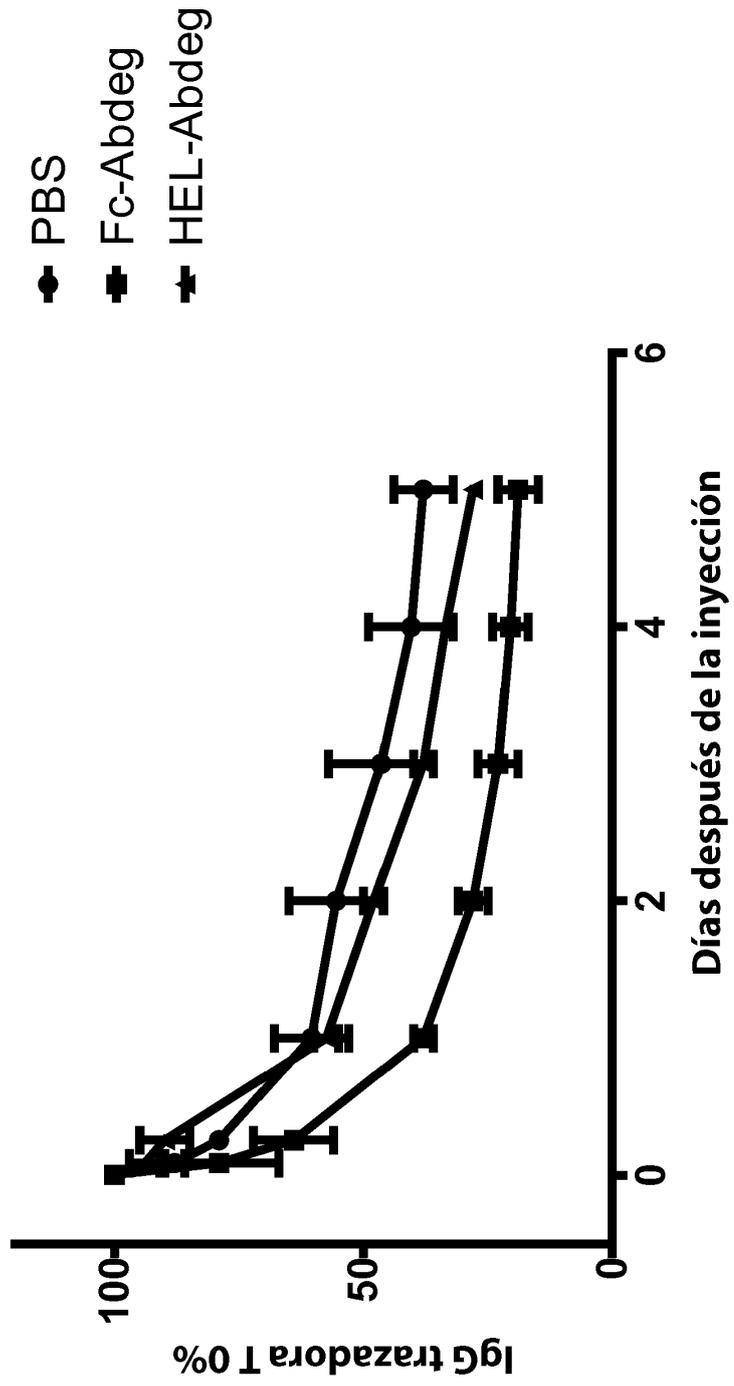
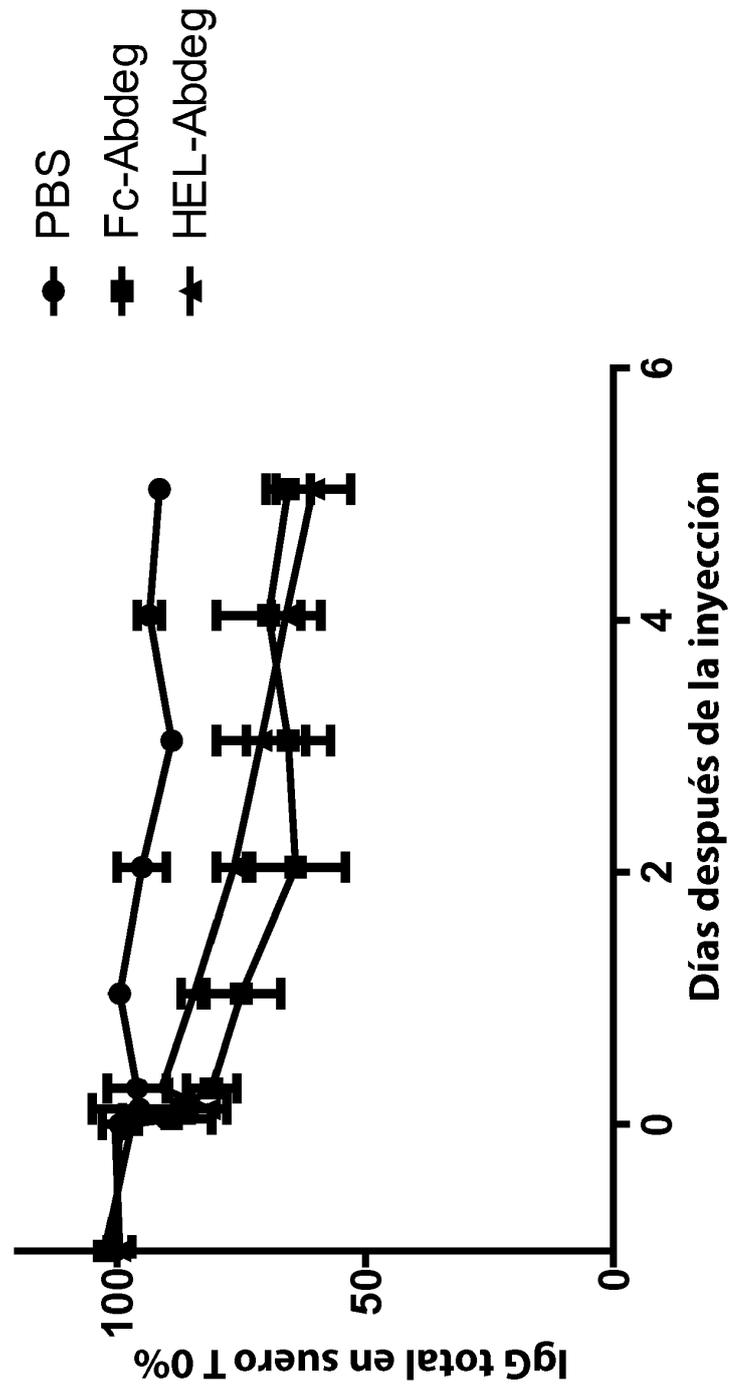
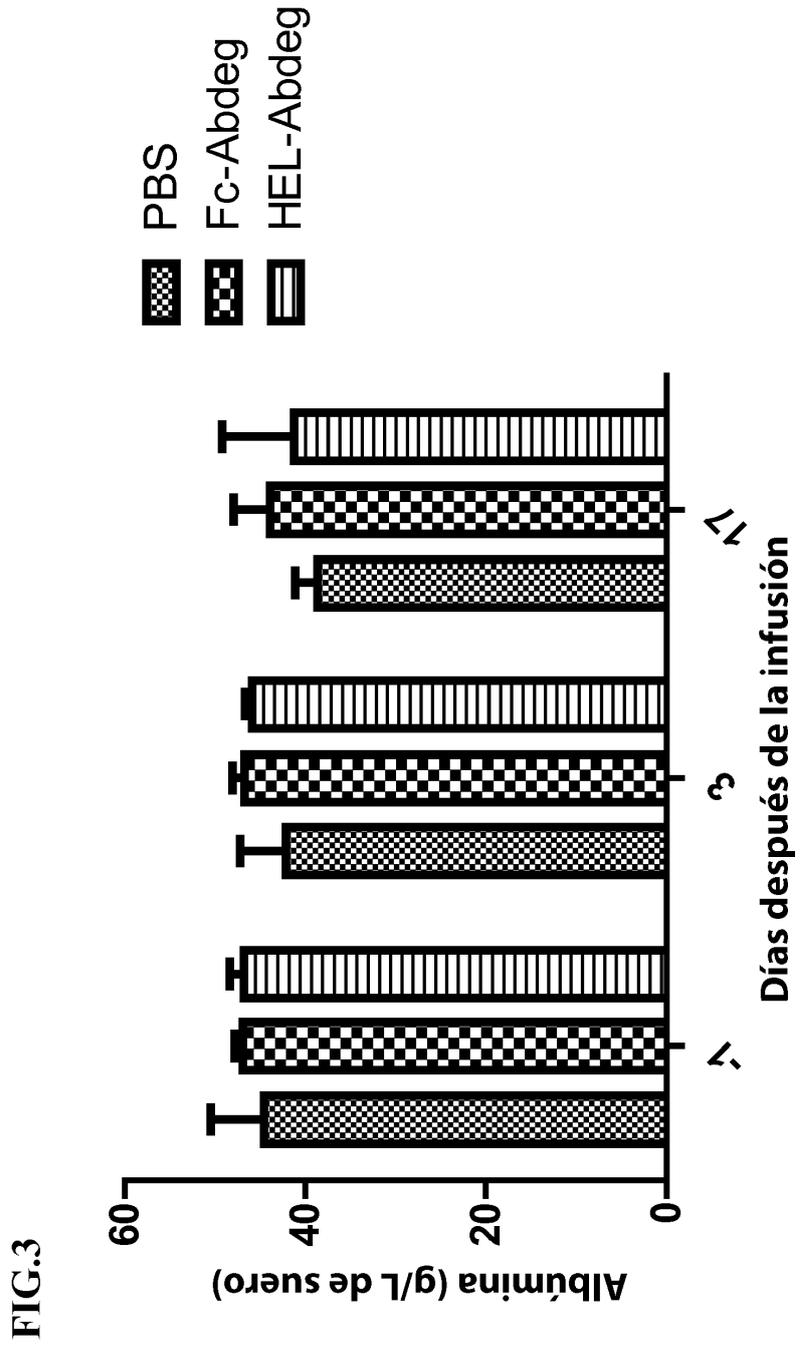
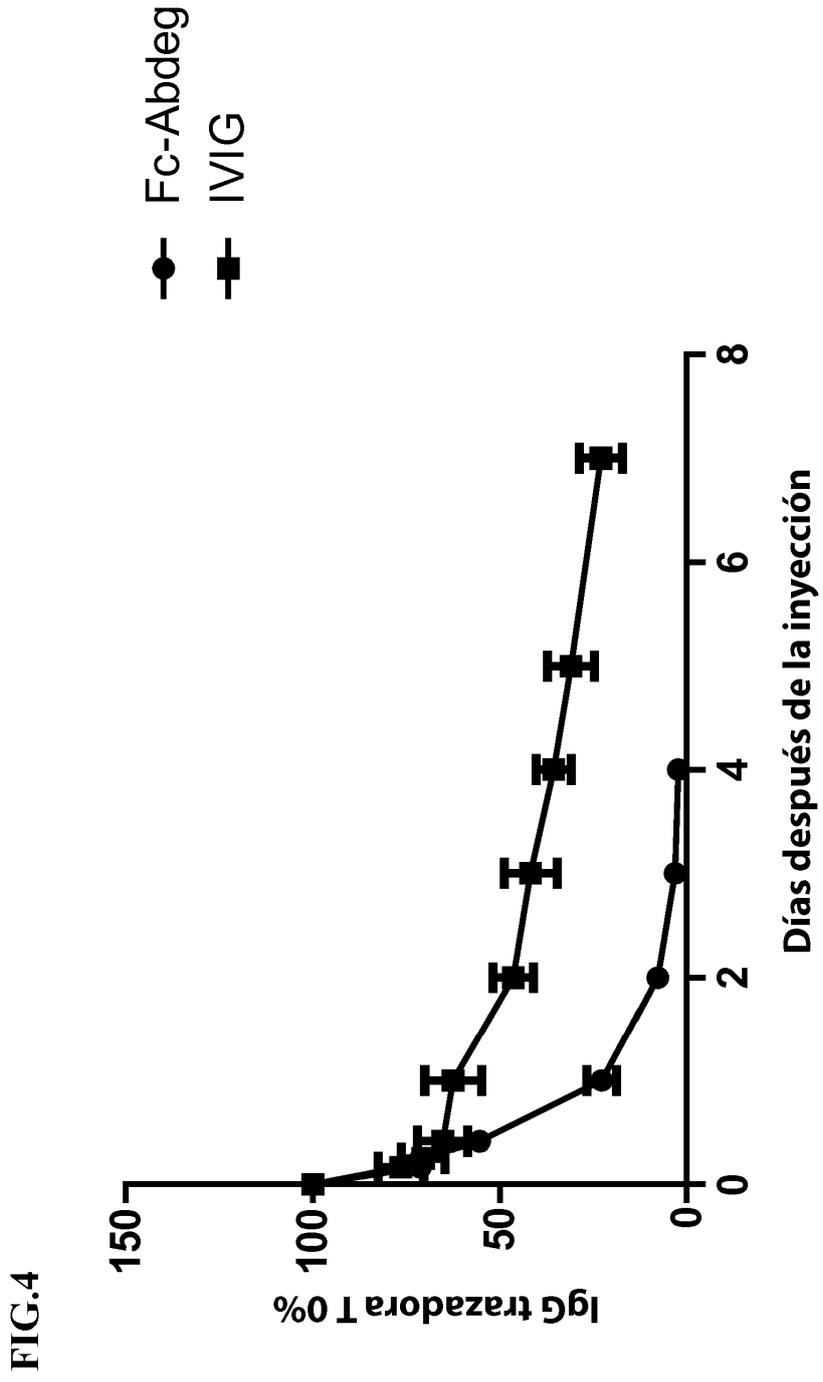
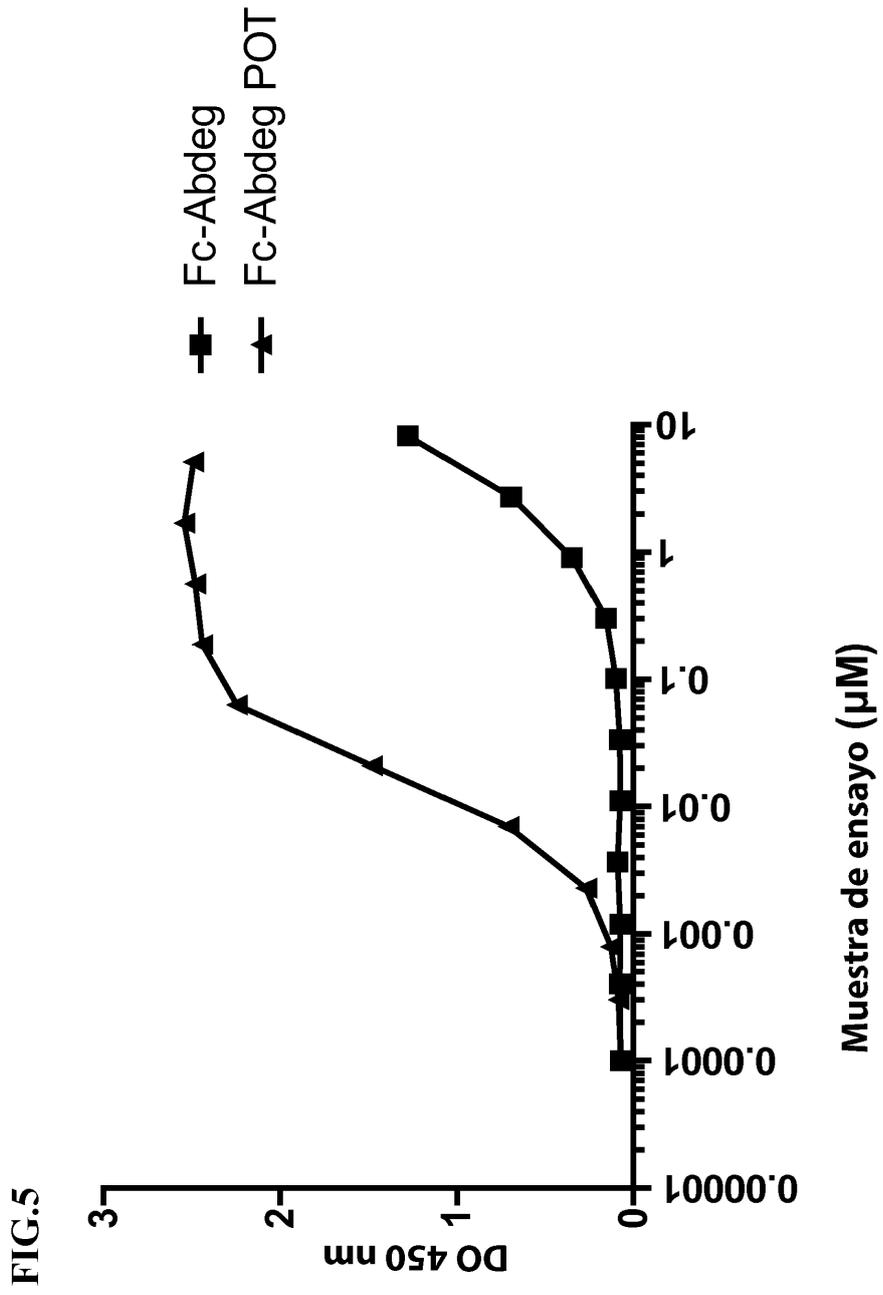


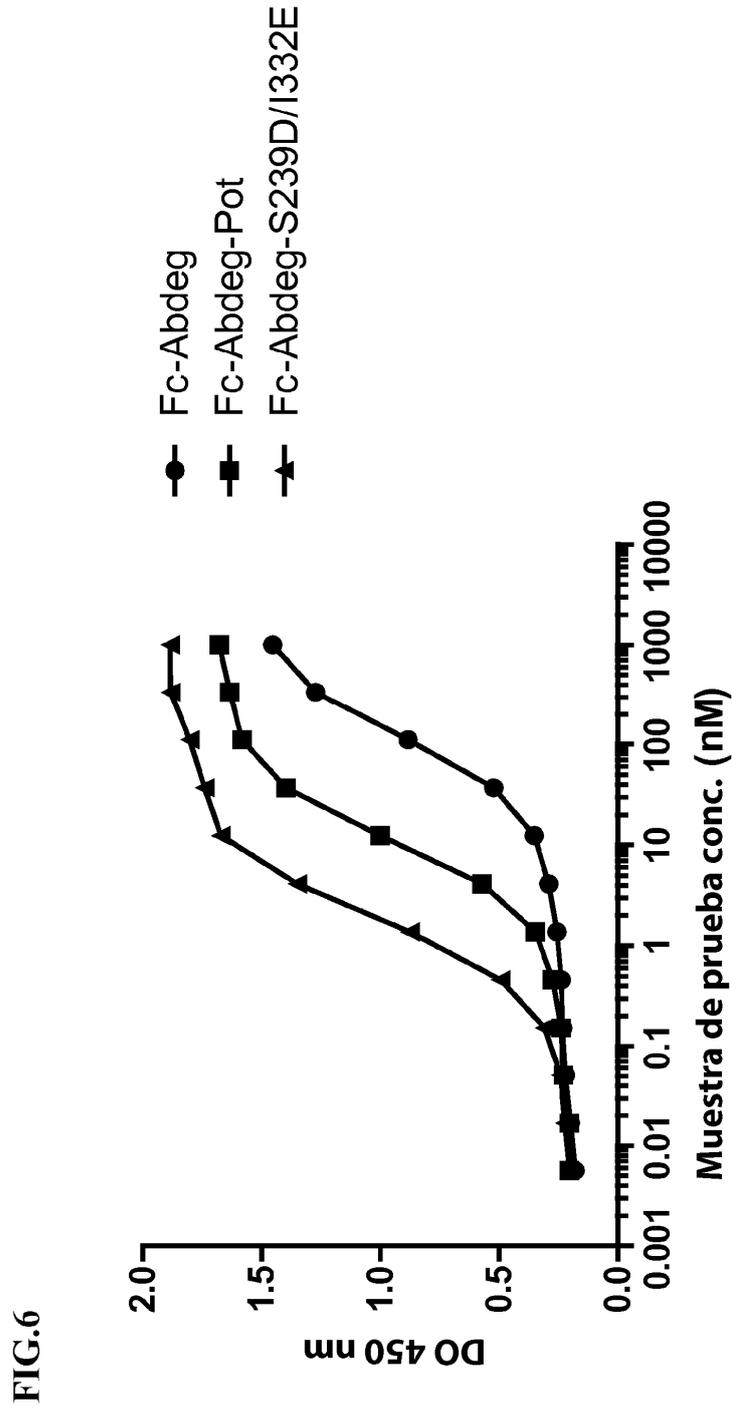
FIG.2

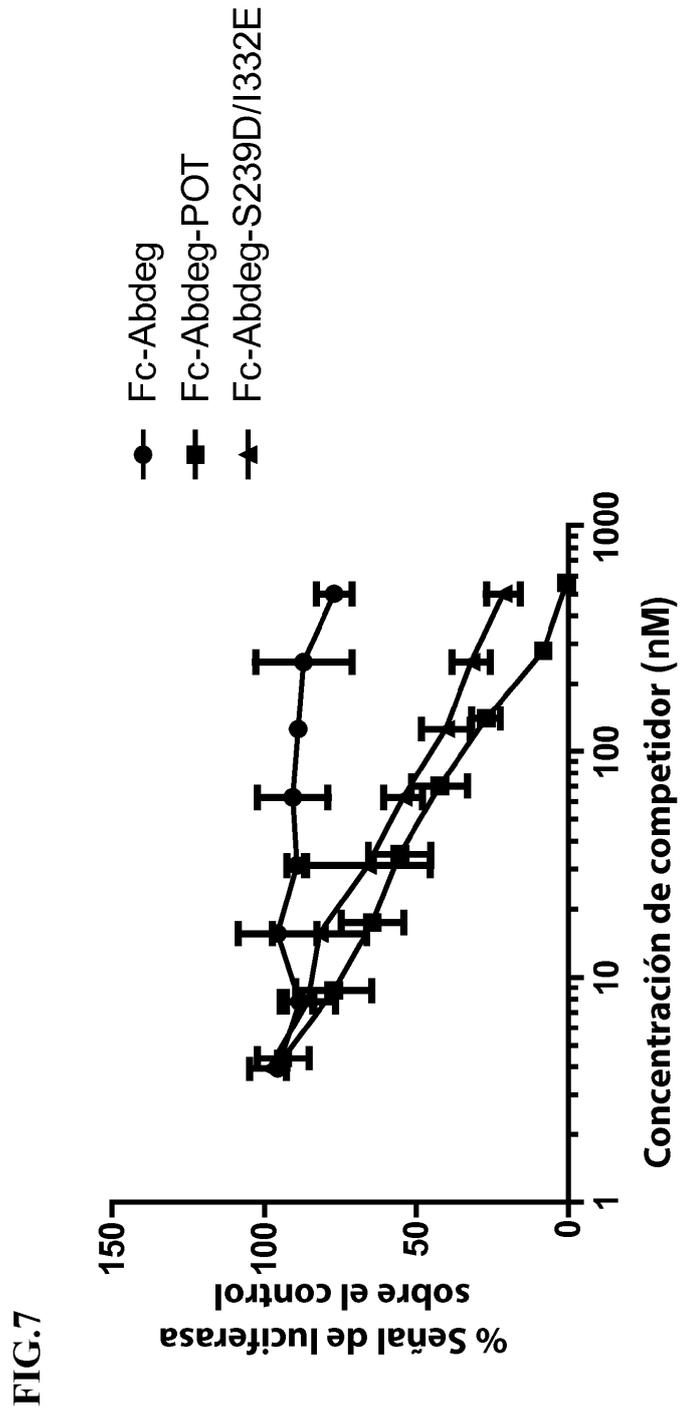












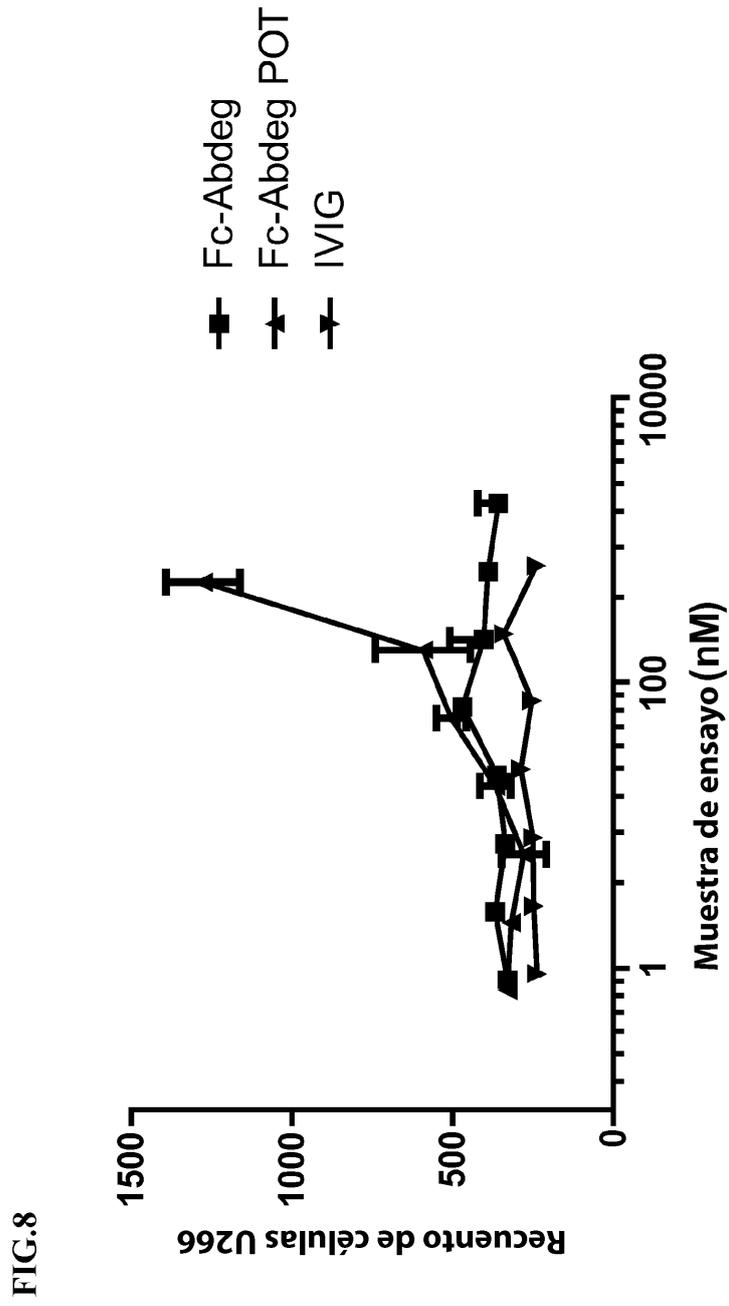


FIG.9

