República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 122022016112-0 B1

(22) Data do Depósito: 13/06/2017

(45) Data de Concessão: 06/06/2023

(54) Título: USOS DE UM ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO QUE SE LIGA ESPECIFICAMENTE A C5

(51) Int.Cl.: C07K 16/18.

(30) Prioridade Unionista: 07/10/2016 US 62/405,561; 14/06/2016 US 62/349,705; 15/11/2016 US 62/422,107.

(73) Titular(es): REGENERON PHARMACEUTICALS, INC..

(72) Inventor(es): YING HU; ADRIANNA LATUSZEK; CARMELO ROMANO; WILLIAM OLSON.

(86) Pedido PCT: PCT US2017037226 de 13/06/2017

(87) Publicação PCT: WO 2017/218515 de 21/12/2017

(85) Data do Início da Fase Nacional: 12/08/2022

(62) Pedido Original do Dividido: BR112018075875-2 - 13/06/2017

(57) Resumo: A presente invenção fornece anticorpos monoclonais que se ligam à proteína do fator de complemento 5 (C5), e métodos de uso dos mesmos. Em várias modalidades da invenção, os anticorpos são anticorpos totalmente humanos que se ligam à proteína C5. Em algumas modalidades, os anticorpos da invenção são úteis para inibir ou neutralizar a atividade de C5, proporcionando assim um meio de tratar ou prevenir uma doença ou distúrbio relacionado com C5 em humanos. Em algumas modalidades, a invenção proporciona um anticorpo anti-C5 que possui propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas melhoradas, por exemplo, uma meia-vida de mais de 10 dias.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"USOS DE UM ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO QUE SE LIGA ESPECIFICAMENTE A C5".**

Dividido do BR112018075875-2, depositado em 13.06.2017.

[001] Este pedido está sendo apresentado em 13 de junho de 2017 como um Pedido de Patente Internacional PCT e reivindica o benefício de prioridade para os pedidos provisórios Nos. 62/349.705, depositados em 14 de junho de 2016; 62/405.561, depositado em 7 de outubro de 2016; e 62/422.107, depositado em 15 de novembro de 2016, as descrições de cada um aqui incorporadas por referência em sua totalidade.

CAMPO DE INVENÇÃO

[002] A presente invenção refere-se a anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos que se ligam especificamente ao fator C5 do complemento e a métodos terapêuticos e diagnósticos de uso desses anticorpos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] O sistema complemento é um grupo de proteínas plasmáticas que, quando ativadas, levam à lise celular alvo e facilitam a fagocitose através da opsonização. O complemento é ativado através de uma série de etapas proteolíticas por três vias principais: a via clássica, que é tipicamente ativada por complexos imunes, a via alternativa que pode ser induzida por superfícies celulares desprotegidas e a via de lectina de ligação à manose. Todas as três vias da cascata do complemento convergem na clivagem proteolítica da proteína do componente 5 (C5) do complemento. A clivagem do componente 5 (C5) do complemento resulta na produção dos fragmentos C5a e C5b, processo crítico durante a ativação da cascata do complemento. C5a pode gerar respostas fisiológicas pleiotrópicas através da ligação aos seus receptores (Monk *et al*., 2007, Br. J.

Pharmacol. 152: 429-448). O C5a é um potente mediador pró-inflamatório que induz a migração quimiotática, aumenta a adesão celular, estimula a explosão oxidativa e induz a liberação de vários mediadores inflamatórios, como histamina ou citocinas. O C5b medeia a formação do complexo de ataque à membrana (MAC ou C5b-9) levando à lise celular nas fases tardias da citotoxicidade dependente do complemento (CDC). Além disso, em células nucleadas resistentes à citólise por C5b-9, quantidades sublíticas de C5b-9 podem causar ativação celular que resulta em proliferação celular, geração de mediadores pró-inflamatórios e produção de matriz extracelular.

[004] Anticorpos monoclonais para C5 são conhecidos na técnica e foram descritos, por exemplo, na Patente US/Publicações Nº 9206251, 9107861, 9079949, 9051365, 8999340, 8883158, 8241628, 7999081, 7432356, 7361339, 7279158, 6534058., 6355245, 6074642, 20160299305, 20160051673, 20160031975, 20150158936, 20140056888, 20130022615, 20120308559, e em WO2015198243, WO2015134894, WO2015120130, EP2563813B1, EP2328616B1 e EP2061810B1.

[005] Os anticorpos totalmente humanos que se ligam especificamente à proteína C5 com alta afinidade e possuem propriedades farmacocinéticas melhoradas podem ser importantes na prevenção e tratamento de várias doenças associadas a C5 (por exemplo, síndrome urêmica hemolítica atípica).

BREVE RESUMO DA INVENÇÃO

[006] A presente invenção fornece anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam especificamente à proteína do fator 5 (C5) do complemento. Os anticorpos da presente invenção são úteis, *inter alia*, para inibir ou neutralizar a atividade da proteína C5. Em certas modalidades, os anticorpos são úteis na prevenção, tratamento ou melhoria de pelo menos um sintoma ou indicação de uma doença ou

distúrbio associado a C5 em um indivíduo. Em certas modalidades, os anticorpos podem ser administrados profilaticamente ou terapeuticamente a um indivíduo com ou em risco de ter uma doença ou distúrbio associado a C5. Em certas modalidades, os anticorpos anti-C5 são anticorpos totalmente humanos que se ligam a C5 com elevada afinidade e possuem propriedades farmacocinéticas (PK) e farmacodinâmicas (PD) melhoradas. Estes anticorpos de alta afinidade com PK/PD melhorada podem ser utilizados para proporcionar uma eficácia superior, juntamente com uma dosagem menos frequente em um indivíduo com uma doença ou distúrbio associado a C5.

[007] Os anticorpos da invenção podem ser de comprimento total (por exemplo, um anticorpo IgG1 ou IgG4) ou podem compreender apenas uma porção de ligação ao antígeno (por exemplo, um fragmento Fab, F $(ab')_2$ ou scFv), e pode ser modificado para afetar a funcionalidade, por exemplo, para aumentar a persistência no hospedeiro ou para eliminar funções efetoras residuais (Reddy *et al*., 2000, J. Immunol. 164: 1925-1933). Em certas modalidades, os anticorpos podem ser biespecíficos.

[008] Em um primeiro aspecto, a presente invenção proporciona anticorpos monoclonais recombinantes isolados ou seus fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam especificamente à proteína C5. Em algumas modalidades, os anticorpos são anticorpos monoclonais totalmente humanos.

[009] Os anticorpos anti-C5 exemplares da presente invenção estão listados nas Tabelas 1 e 2 da presente invenção. A Tabela 1 apresenta os identificadores de sequência de aminoácidos das regiões variáveis de cadeia pesada (HCVR), regiões variáveis de cadeia leve (LCVRs), regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) e regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) de

anticorpos anti-C5 exemplares. A Tabela 2 apresenta os identificadores de sequência de ácido nucleico da HCVRs, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3 dos anticorpos anti-C5 exemplares.

[010] A presente invenção fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma HCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos HCVR listadas na Tabela 1, ou uma sequência substancialmente semelhante tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[011] A presente invenção também proporciona anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma LCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos LCVR listadas na Tabela 1, ou uma sequência substancialmente semelhante tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[012] A presente invenção também fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma HCVR e um par de sequência de aminoácidos LCVR (HCVR/LCVR) compreendendo qualquer uma das sequências de aminoácidos HCVR listadas na Tabela 1 emparelhadas com qualquer uma das sequências de aminoácidos LCVR listados na Tabela 1. De acordo com certas modalidades, a presente invenção fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo um par de sequências de aminoácidos HCVR/LCVR contido em qualquer um dos anticorpos anti-C5 exemplares listados na Tabela 1. Em certas modalidades, o par de sequências de aminoácidos de HCVR/LCVR é selecionado a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 98/114, 122/106, 98/130,

138/106, 146/106, 122/130, 146/114, 146/130, 138/130, 154/162, 170/178, 186/194, 202/210, 218/226, 234/242, 250/258, 266/258, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330 e 338/346. Em certas modalidades, par de sequências de aminoácidos de HCVR/LCVR é selecionado a partir de uma das SEQ ID NOs: 50/58 (por exemplo, H4H12161P), 98/106 (por exemplo, H4H12166P), 138/106 (por exemplo, H4H12166P5), ou 202/210 (por exemplo, H4H12170P). Em certas modalidades, a presente invenção fornece anticorpos anti-C5 ou seus fragmentos de ligação ao antígeno compreendendo uma HCVR e uma LCVR, a referida HCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos listada na Tabela 1 tendo não mais de cinco substituições de aminoácidos, e a LCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos listada na Tabela 1, tendo não mais do que duas substituições de aminoácidos. Por exemplo, a presente invenção proporciona anticorpos anti-C5 ou seus fragmentos de ligação ao antígeno compreendendo uma HCVR e uma LCVR, a referida HCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98 possuindo n mais do que cinco substituições de aminoácidos e a referida LCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 106 tendo não mais do que duas substituições de aminoácidos. Em outra modalidade, a presente invenção proporciona anticorpos anti-C5 ou seus fragmentos de ligação ao antígeno compreendendo uma HCVR e um LCVR, o referido HCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98 possuindo pelo menos uma substituição de aminoácidos, e o referido LCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 106 tendo uma substituição de aminoácido.

[013] A presente invenção também fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma cadeia pesada de CDR1 (HCDR1) compreendendo uma sequência de

aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácido HCDR1 listadas na Tabela 1 ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[014] A presente invenção também fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma CDR2 de cadeia pesada (HCDR2) compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos HCDR2 listadas na Tabela 1 ou uma sequência substancialmente similar da mesma contendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[015] A presente invenção também proporciona anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma CDR3 de cadeia pesada (HCDR3) compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos HCDR3 listadas na Tabela 1 ou uma sequência substancialmente semelhante da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[016] A presente invenção também fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma CDR1 de cadeia leve (LCDR1) compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos da LCDR1 listadas na Tabela 1 ou uma sequência substancialmente similar da mesma contendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[017] A presente invenção também fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma CDR2 de cadeia leve (LCDR2) compreendendo uma sequência de aminoácidos

selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos da LCDR2 listadas na Tabela 1 ou uma sequência substancialmente similar da mesma contendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[018] A presente invenção também fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma cadeia leve de CDR3 (LCDR3) compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos da LCDR3 listadas na Tabela 1 ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[019] A presente invenção também fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo um HCDR3 e um par de sequência de aminoácidos LCDR3 (HCDR3/LCDR3) compreendendo qualquer uma das sequências de aminoácidos HCDR3 listadas na Tabela 1 emparelhadas com qualquer uma das sequências de aminoácidos da LCDR3 listados na Tabela 1. De acordo com certas modalidades, a presente invenção fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo um par de sequências de aminoácidos HCDR3/LCDR3 contido em qualquer um dos anticorpos anti-C5 exemplares listados na Tabela 1. Em certas modalidades, o par de sequências de aminoácidos HCDR3/LCDR3 é selecionado a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 56/64 (por exemplo, H4H12161P), 104/112 (por exemplo, H4H12166P), 144/112 (por exemplo, H4H12166P5) e 208/216 (por exemplo, H4H12170P).

[020] A presente invenção também fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma HCVR e uma LCVR, mencionando HCVR compreendendo HCDR1 compreendendo uma sequência de aminoácido diferindo de uma sequência de aminoácido listada na Tabela 1 por 1 aminoácido, HCDR2

compreendendo uma sequência de aminoácidos que difere de uma sequência de aminoácidos listada na Tabela 1 por 1 aminoácido e HCDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos diferente de uma sequência de aminoácidos listada na Tabela 1 por 1 aminoácido. Em certas modalidades, a presente invenção proporciona anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma HCVR e uma LCVR, a referida LCVR compreendendo LCDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos diferindo de uma sequência de aminoácidos listada na Tabela 1 por 1 aminoácido, LCDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos que difere de uma sequência de aminoácidos listada na Tabela 1 por 1 aminoácido, e LCDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos diferente de uma sequência de aminoácidos listada na Tabela 1 por 1 aminoácido. Por exemplo, a presente invenção proporciona anticorpos anti-C5, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma HCVR e uma LCVR, o referido HCVR compreendendo HCDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 100 ou uma sequência de aminoácidos diferente da SEQ ID NO: 100 por 1 aminoácido, HCDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 102 ou uma sequência de aminoácidos diferente da SEQ ID NO: 102 por 1 aminoácido e HCDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 104 ou uma sequência de aminoácidos que difere da SEQ ID NO: 104 por 1 aminoácido. Em outra modalidade exemplar, a presente invenção proporciona anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma HCVR e uma LCVR, a referida LCVR compreendendo LCDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 108 ou uma sequência de aminoácidos diferente da SEQ ID NO: 108 por 1 aminoácido, LCDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 110 ou uma sequência de aminoácidos diferente da SEQ ID NO: 110 por 1 aminoácido e

LCDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 112 ou uma sequência de aminoácidos que difere da SEQ ID NO: 112 por 1 aminoácido.

[021] A presente invenção fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 353, ou uma sequência substancialmente semelhante da mesma contendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[022] A presente invenção também proporciona anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 354, ou uma sua sequência substancialmente semelhante tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[023] Em certas modalidades, a presente invenção fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 353, ou uma sequência substancialmente semelhante da mesma contendo pelo menos 80%, ou pelo menos 90% identidade de sequência; e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 354, ou uma sequência substancialmente semelhante da mesma tendo pelo menos 80%, ou pelo menos 90% de identidade de sequência.

[024] A presente invenção também fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo um conjunto de seis CDRs (isto é, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contidos em qualquer um dos anticorpos anti-C5 exemplares listados na Tabela 1. Em certas modalidades, o conjunto de sequências de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 é

selecionado a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 52-54-56-60-62-64 (por exemplo, H4H12161P), 100-102-104-108-110-112 (por exemplo, H4H12166P), 140-142-144-108-110-112 (por exemplo, H4H12166P5) e 204-206-208-212-214-216 (por exemplo, H4H12170P).

[025] Em uma modalidade relacionada, a presente invenção fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo um conjunto de seis CDRs (isto é, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contidos em um par de sequências de aminoácido HCVR/LCVR, conforme definido por qualquer um dos anticorpos anti-C5 exemplares listados na Tabela 1. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo as sequências de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 contidas em um par de sequências de aminoácidos HCVR/LCVR selecionado a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 50/58 (por exemplo, H4H12161P), 98/106 (por exemplo, H4H12166P), 138/106 (por exemplo, H4H12166P5) ou 202/210 (por exemplo, H4H12170P). Os métodos e técnicas para identificar CDRs nas sequências de aminoácidos de HCVR e LCVR são bem conhecidos na técnica e podem ser utilizados para identificar CDRs dentro das sequências de aminoácidos de HCVR e/ou LCVR especificadas aqui descritas. Convenções exemplares que podem ser usadas para identificar os limites de CDRs incluem, por exemplo, a definição de Kabat, a definição de Chothia e a definição de AbM. Em termos gerais, a definição de Kabat é baseada na variabilidade de sequências, a definição de Chothia é baseada na localização das regiões de loop estruturais, e a definição de AbM é um compromisso entre as abordagens de Kabat e Chothia. Veja, por exemplo, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (1991); Al-Lazikani *et al*. *J. Mol. Biol.* 273: 927-948 (1997); e Martin *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 86: 9268-

9272 (1989). Bases de dados públicos também estão disponíveis para identificar sequências de CDR dentro de um anticorpo.

[026] Em certas modalidades, a presente invenção inclui um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a C5, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende três regiões determinantes de complementaridade de cadeias pesadas (CDRs) (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) contida em uma região variável de cadeia pesada (HCVR) e três CDRs de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) contidas em uma região variável de cadeia leve (LCVR), em que a HCVR compreende: (i) a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98, (ii) uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 98, (iii) uma sequência de aminoácidos com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 98; ou (iv) a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98 não tendo mais de 5 substituições de aminoácidos; e a LCVR compreende: (i) a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 106, (ii) uma sequência de aminoácidos com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 106, (iii) uma sequência de aminoácidos com pelo menos 95% identidade com a SEQ ID NO: 106; ou (iv) a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 106 não tendo mais do que 5 substituições de aminoácidos.

[027] A presente invenção inclui anticorpos anti-C5 possuindo um padrão de glicosilação modificado. Em algumas modalidades, a modificação para remover sítios de glicosilação indesejáveis pode ser útil, ou um anticorpo sem uma porção de fucose presente na cadeia de oligossacarídeo, por exemplo, para aumentar a função da citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (veja, Shield *et al*. (2002) JBC 277: 26733). Em outros pedidos, a modificação da galactosilação pode ser feita a fim de modificar a citotoxicidade dependente do complemento (CDC).

[028] Em certas modalidades, a presente invenção proporciona anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno que exibem ligação dependente do pH a C5. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno que ligam C5 com maior afinidade o pH neutro do que o pH ácido (isto é, ligação reduzida o pH ácido).

[029] Em certas modalidades, a presente invenção fornece anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno que exibem propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas melhoradas, por exemplo, a presente invenção fornece anticorpos anti-C5 que possuem meia-vida sérica estendida. Em certas modalidades, os anticorpos anti-C5 da presente invenção têm uma concentração sérica de mais de 10 µg/mL até ao dia 40 em camundongos humanizados em C5. Em certas modalidades, os anticorpos anti-C5 da presente invenção bloqueiam a hemólise por CP e AP ao dia 35 após administração a camundongos humanizados em C5.

[030] A presente invenção também proporciona anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno que competem pela ligação específica a C5 com um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreendendo as CDRs de uma HCVR e as CDRs de uma LCVR, em que a HCVR e a LCVR cada uma tem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir das sequências de HCVR e LCVR listadas na Tabela 1.

[031] A presente invenção também proporciona anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno que competem de forma cruzada pela ligação a C5 com um anticorpo de referência ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreendendo as CDRs de uma HCVR e as CDRs de uma LCVR, em que a HCVR e a LCVR possuem, cada uma, uma sequência de aminoácidos selecionada a partir das sequências de HCVR e LCVR listadas na Tabela 1.

[032] A presente invenção também proporciona anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam ao mesmo epítopo como um anticorpo de referência ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreendendo as CDRs de uma HCVR e as CDRs de uma LCVR, em que a HCVR e a LCVR possuem cada uma delas uma sequência de aminoácido selecionada a partir das sequências HCVR e LCVR listadas na Tabela 1. Em certas modalidades, a presente invenção proporciona anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam ao mesmo epítopo que um anticorpo de referência ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreendendo as CDRs de uma HCVR e as CDRs de uma LCVR, em que o par de sequências de aminoácidos HCVR/LCVR tem SEQ ID NOs: 98/106.

[033] A presente invenção também inclui anticorpos anti-C5 e seus fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam a um ou mais resíduos de aminoácidos compreendidos na cadeia alfa e/ou na cadeia beta de C5. Em certas modalidades, a presente invenção fornece anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam a um ou mais aminoácidos na cadeia alfa de C5 e um ou mais aminoácidos na cadeia beta de C5. Em certas modalidades, a presente invenção proporciona anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam a um ou mais aminoácidos nas cadeias alfa e beta de C5, em que os anticorpos não se ligam ao domínio de anafilatoxina C5a. Em certas modalidades, a presente invenção fornece anticorpos anti-C5 que interagem com um ou mais aminoácidos contidos no C5 humano (SEQ ID NO: 359). Em certas modalidades, a presente invenção fornece anticorpos anti-C5 que interagem com um ou mais aminoácidos contidos na C5 humana (SEQ ID NO: 359), em que os anticorpos não se ligam ao domínio de anafilatoxina C5a de C5. Em certas modalidades, a presente invenção proporciona anticorpos anti-C5 e seus fragmentos de ligação ao antígeno que interagem com uma

sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo de (a) aminoácidos 591 a 599 da SEQ ID NO: 359; (b) aminoácidos 593 a 599 da SEQ ID NO: 359; (c) aminoácidos 775 a 787 da SEQ ID NO: 359; (d) aminoácidos 775 a 794 da SEQ ID NO: 359; e (e) aminoácidos 779 a 787 da SEQ ID NO: 359. Em certas modalidades, a presente invenção proporciona anticorpos anti-C5 e seus fragmentos de ligação ao antígeno que interagem com um ou mais aminoácidos contidos na SEQ ID NO: 359, por exemplo, a presente invenção fornece anticorpos anti-C5 e seus fragmentos de ligação ao antígeno que interagem com pelo menos 5 aminoácidos, pelo menos 10 aminoácidos, ou pelo menos 15 aminoácidos contidos na SEQ ID NO: 361. Em certas modalidades, a presente invenção fornece anticorpos anti-C5 e seus fragmentos de ligação ao antígeno que interagem com um ou mais aminoácidos contidos na SEQ ID NO: 359, por exemplo, a presente invenção fornece anticorpos anti-C5 e seus fragmentos de ligação ao antígeno que interagem com pelo menos 5 aminoácidos contidos na SEQ ID NO: 360. Em certas modalidades, a presente invenção proporciona anticorpos anti-C5 e seus fragmentos de ligação ao antígeno que interagem com pelo menos 5 aminoácidos contidos na SEQ ID NOs: 360 e 361. Em certas modalidades, a presente invenção proporciona anticorpos anti-C5 e seus fragmentos de ligação ao antígeno que interagem com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 360 (correspondente aos aminoácidos 591 a 599 de SEQ ID NO: 359) e com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 361 (correspondendo aos aminoácidos 775 a 794 da SEQ ID NO: 359).

[034] Em algumas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno pode ligar-se especificamente a C5 de uma maneira agonista, ou seja, pode aumentar ou estimular a ligação e/ou atividade de C5; em outras modalidades, o anticorpo pode ligar-se especificamente a C5 de um modo antagonista, isto é, pode bloquear a

ligação e/ou atividade de C5.

[035] A presente invenção também fornece anticorpos isolados e seus fragmentos de ligação ao antígeno que bloqueiam a ligação de C5 à C5 convertase. Em algumas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno que bloqueia a ligação de C5 à C5 convertase pode ligar-se ao mesmo epítopo em C5 como C5 convertase ou pode ligar-se a um epítopo diferente em C5 como C5 convertase. Em algumas modalidades, a presente invenção fornece anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno que bloqueiam a ligação de C5 à C5 convertase de macaco.

[036] Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da presente invenção são biespecíficos compreendendo uma primeira especificidade de ligação a um primeiro epítopo da proteína C5 e uma segunda especificidade de ligação a um segundo epítopo da proteína C5, em que os primeiro e segundo epítopos são distintos e sem sobreposição.

[037] Em certas modalidades, os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno da presente invenção ligam-se a C5a com uma IC_{50} inferior a 0,5 nM. Em certas modalidades, os anticorpos compreendem uma HCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 290, 306, 322 e 338. Em certas modalidades, os anticorpos compreendem uma LCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 298, 314, 330 e 346.

[038] Em certas modalidades, a presente invenção proporciona um anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno que possui uma ou mais das seguintes características: (a) é um anticorpo monoclonal totalmente humano; (b) liga-se ao C5 humano com uma constante de dissociação (K_D) inferior a 0,9 nM a 25°C, conforme medido em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície; (c) liga-

se ao C5 humano com uma K_D inferior a 0,3 nM a 37°C, conforme medido em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície; (d) liga-se ao C5 de macaco com uma K_D inferior a 65 nM, conforme medido em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície; (e) liga-se à variante C5 humana R885H (SEQ ID NO: 356) com uma K_D inferior a 0,5 nM, conforme medido em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície; (f) liga-se à variante C5 humana R885C (SEQ ID NO: 357) com uma K_D inferior a 0,5 nM, conforme medido em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície; (g) bloqueia a hemólise por via clássica (PC) mediada por C5 humana em mais de 95% e com IC_{50} inferior a 6 nM, conforme medido em um ensaio de hemólise por CP; (h) bloqueia a hemólise por via alternativa mediada por C5 humana (AP) em mais de 70% e com IC_{50} inferior a 165 nM, conforme medido em um ensaio de hemólise por AP; (i) inibe a hemólise de PC mediada por C5 de macaco verde africano com IC_{50} inferior a 185 nM, conforme medido em um ensaio de hemólise por CP; (j) inibe a hemólise de AP mediada por C5 de macaco verde africano com IC_{50} inferior a 235 nM, conforme medido em um ensaio de hemólise de PA; (k) inibe a hemólise por CP mediada por C5 de macaco cynomolgus com IC_{50} inferior a 145 nM, conforme medido em um ensaio de hemólise por CP; e (l) inibe a hemólise de PA mediada por C5 de macaco cynomolgus com IC_{50} inferior a 30 nM, conforme medido em um ensaio de hemólise por AP.

[039] Em certas modalidades, a presente invenção fornece um anticorpo monoclonal anti-C5 recombinante isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que possui uma ou mais das seguintes características: (a) compreende um conjunto de seis CDRs compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 100-102-104-108-110-112; (b) liga-se ao C5 humano com uma constante de dissociação (K_D) inferior a 0,2 nM a 25°C, conforme medido em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície; (c) liga-se ao C5

humano com uma K_D inferior a 0,3 nM a 37°C, conforme medido em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície; (d) liga-se a uma variante C5 humana (R885H) com uma K_D inferior a 0,4 nM a 37°C, conforme medido em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície; (e) inibe a hemólise mediada pela via clássica (CP) do soro humano com uma IC_{50} inferior a 3 nM; (f) inibe a hemólise mediada pelo caminho alternativo (AP) do soro humano com uma IC_{50} inferior a 27 nM; (g) inibe a hemólise mediada por CP do soro de macaco com uma IC_{50} inferior a 21 nM; (g) inibe a hemólise mediada por AP do soro de macaco com uma IC_{50} inferior a 10 nM; (h) tem uma meia-vida no soro (t1/2) superior a 10 dias em camundongos humanizados com C5; (i) tem concentração sérica de mais de 10 µg/mL até ao dia 40 após administração a camundongos humanizados C5; (j) bloqueia a hemólise mediada por CP até ao dia 50 em camundongos humanizados em C5; e (k) se liga a um ou mais aminoácidos compreendidos na cadeia alfa e/ou na cadeia beta da SEQ ID NO: 359, em que o anticorpo não se liga ao domínio de anafilatoxina C5a de C5.

[040] Em um segundo aspecto, a presente invenção fornece moléculas de ácido nucleico que codificam anticorpos anti-C5 ou suas porções. Por exemplo, a presente invenção fornece moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCVR listadas na Tabela 1; em certas modalidades a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência polinucleotídica selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ácido nucleico de HCVR listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente semelhante da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[041] A presente invenção também fornece moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma das sequências de aminoácidos de LCVR listadas na Tabela 1; em certas modalidades a molécula de

ácido nucleico compreende uma sequência polinucleotídica selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ácido nucleico de LCVR listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente semelhante desta tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[042] A presente invenção também fornece moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCDR1 listadas na Tabela 1; em certas modalidades a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência polinucleotídica selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ácido nucleico de HCDR1 listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente semelhante da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[043] A presente invenção também fornece moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCDR2 listadas na Tabela 1; em certas modalidades a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência polinucleotídica selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ácido nucleico de HCDR2 listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente semelhante da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[044] A presente invenção também fornece moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCDR3 listadas na Tabela 1; em certas modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência polinucleotídica selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ácido nucleico de HCDR3 listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente semelhante da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[045] A presente invenção também fornece moléculas de ácido

nucleico que codificam qualquer uma das sequências de aminoácidos da LCDR1 listadas na Tabela 1; em certas modalidades a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência polinucleotídica selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ácido nucleico de LCDR1 listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente semelhante da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[046] A presente invenção também fornece moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma das sequências de aminoácidos da LCDR2 listadas na Tabela 1; em certas modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência polinucleotídica selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ácido nucleico de LCDR2 listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente similar desta tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[047] A presente invenção também proporciona moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma das sequências de aminoácidos da LCDR3 listadas na Tabela 1; em certas modalidades a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência polinucleotídica selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ácido nucleico de LCDR3 listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente semelhante da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[048] A presente invenção também proporciona moléculas de ácido nucleico que codificam uma HCVR, em que a HCVR compreende um conjunto de três CDRs (isto é, HCDR1-HCDR2-HCDR3), em que o conjunto de sequências de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3 é como definido por qualquer um dos anticorpos anti-C5 exemplares listados na Tabela 1.

[049] A presente invenção também proporciona moléculas de

ácido nucleico que codificam uma LCVR, em que a LCVR compreende um conjunto de três CDRs (isto é, LCDR1-LCDR2-LCDR3), em que o conjunto de sequências de aminoácidos LCDR1-LCDR2-LCDR3 é como definido por qualquer um dos anticorpos anti-C5 exemplares listados na Tabela 1.

[050] A presente invenção também proporciona moléculas de ácido nucleico que codificam tanto uma HCVR como uma LCVR, em que a HCVR compreende uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCVR listadas na Tabela 1 e em que a LCVR compreende uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das sequências de aminoácidos de LCVR listadas na Tabela 1. Em certas modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada a partir de qualquer das sequências de ácido nucleico de HCVR listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente semelhante tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência, e uma sequência de polinucleotídeo selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ácido nucleico de LCVR listadas na Tabela 1, ou uma sequência substancialmente semelhante da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência. Em certas modalidades de acordo com este aspecto da invenção, a molécula de ácido nucleico codifica uma HCVR e LCVR, em que a HCVR e a LCVR são ambas derivadas do mesmo anticorpo anti-C5 listado na Tabela 1.

[051] Em um aspecto relacionado, a presente invenção proporciona vetores de expressão recombinantes capazes de expressar um polipeptídeo compreendendo uma região variável de cadeia pesada ou leve de um anticorpo anti-C5. Por exemplo, a presente invenção inclui vetores de expressão recombinantes compreendendo qualquer uma das moléculas de ácido nucleico mencionadas acima, isto é,

moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma das sequências HCVR, LCVR e/ou CDR conforme estabelecido na Tabela 2. Também incluído no escopo da presente invenção são células hospedeiras nas quais tais vetores foram introduzidos, assim como métodos de produção dos anticorpos ou porções dos mesmos por cultura das células hospedeiras sob condições que permitem a produção dos anticorpos ou fragmentos de anticorpo e recuperação dos anticorpos e fragmentos de anticorpos produzidos.

[052] Em um terceiro aspecto, a invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de pelo menos um anticorpo monoclonal recombinante ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente a C5 e um veículo farmaceuticamente aceitável. Em um aspecto relacionado, a invenção apresenta uma composição que é uma combinação de um anticorpo anti-C5 e um segundo agente terapêutico. Em uma modalidade, o segundo agente terapêutico é qualquer agente que é vantajosamente combinado com um anticorpo anti-C5. Agentes exemplares que podem ser vantajosamente combinados com um anticorpo anti-C5 incluem, sem limitação, outros agentes que se ligam e/ou inibem a atividade de C5 (incluindo outros anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, etc.) e/ou agentes que não diretamente ligam-se a C5 mas no entanto tratam ou melhoram pelo menos um sintoma ou indicação de uma doença ou distúrbio associado a C5. Terapias combinadas adicionais e coformulações envolvendo os anticorpos anti-C5 da presente invenção são aqui descritas em outro local.

[053] Em um quarto aspecto, a invenção proporciona métodos terapêuticos para o tratamento de uma doença ou distúrbio associado a C5 em um indivíduo utilizando um anticorpo anti-C5 ou uma porção de ligação ao antígeno de um anticorpo da invenção, em que os métodos

terapêuticos compreendem a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo da invenção ao indivíduo disso necessitado. O distúrbio tratado é qualquer doença ou condição que é aperfeiçoada, melhorada, inibida ou evitada pela inibição da atividade de C5. Em certas modalidades, a invenção proporciona métodos para prevenir, tratar ou melhorar pelo menos um sintoma da síndrome urêmica hemolítica atípica (aHUS), o método compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-C5 ou seu fragmento de ligação ao antígeno da invenção a um indivíduo disso necessitado. Em algumas modalidades, a presente invenção proporciona métodos para melhorar ou reduzir a gravidade de pelo menos um sintoma ou indicação de hemoglobinúria paroxística noturna (PNH) em um indivíduo através da administração de um anticorpo anti-C5 da invenção. Em algumas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno pode ser administrado profilaticamente ou terapeuticamente a um indivíduo com ou em risco de ter uma doença ou distúrbio associado a C5. Em certas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno da invenção é administrado em combinação com um segundo agente terapêutico ao indivíduo disso necessitado. O segundo agente terapêutico pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em um fármaco anti-inflamatório (tais como corticosteroides e fármacos anti-inflamatórios não esteroides), um anticorpo diferente da proteína C5, um suplemento dietético tal como antioxidantes e qualquer outro fármaco ou terapia conhecida na técnica. Em certas modalidades, o segundo agente terapêutico pode ser um agente que ajude a neutralizar ou reduzir quaisquer efeitos secundários possíveis associados a um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno da invenção, se tal (s) efeito (s)

lateral (ais) ocorrer (em). O anticorpo ou seu fragmento pode ser administrado subcutaneamente, intravenosamente, intradermicamente, intraperitonealmente, oralmente ou intramuscularmente. O anticorpo ou seu fragmento pode ser administrado a uma dose de cerca de 0,1 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal do indivíduo. Em certas modalidades, um anticorpo da presente invenção pode ser administrado em uma ou mais doses compreendendo entre 50 mg a 600 mg.

[054] A presente invenção também inclui a utilização de um anticorpo anti-C5 ou seu fragmento de ligação ao antígeno da invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou distúrbio que beneficiaria do bloqueio da ligação de C5 e/ou atividade.

[055] Outras modalidades tornar-se-ão evidentes a partir de uma revisão da descrição detalhada que se segue.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[056] A **Figura 1** mostra a inibição dos níveis de C5a pelo anticorpo anti-C5 H4H12166P de uma maneira dependente da dose, conforme determinado por ELISA (descrito no Exemplo 9).

[057] A **Figura 2** mostra a concentração sérica total em função do tempo após uma única injeção intravenosa de 15 mg/kg de H4H12166P, H4H12161P ou Comparador 2 em macacos cynomolgus machos (descritos no Exemplo 10). Os perfis de concentração-tempo foram plotados através do resultado da primeira dose após dose abaixo do limite de quantificação (BLQ), se aplicável, que foi imputado como LLOQ/2. Cada ponto de dados representa a média (± SD) (n = 4 animais/grupo). As concentrações consideradas afetadas pela ADA foram excluídas de 1 animal no grupo H4H12166P e 1 animal no grupo H4H12161P, começando no dia 36 e no dia 29, respectivamente. LLOQ = Limite inferior de quantificação

[058] A **Figura 3** mostra a percentagem de hemólise vs. tempo em

ensaios de Via Clássica (a) de células vermelhas do sangue (B) e Via Alternativa após uma única injeção intravenosa de H4H12166P, H4H12161P ou Comparador 2 em macacos cynomolgus machos. A% de hemólise, calculada como uma relação da lise experimental vs. máxima com% de base de lise subtraído de ambos os valores, está relacionada com a quantidade de C5 inibida pelo anticorpo anti-C5 particular presente no soro em um dado momento. Cada ponto de dados representa a média (± SD).

[059] A **Figura 4** mostra a concentração sérica total versus os perfis de tempo de anticorpos anti-C5 selecionados em camundongos humanizados para C5 (descritos no Exemplo 11). Aos camundongos C5 humanizados foi administrada uma dose subcutânea de 15 mg/kg única de H4H12166P, Comparador 1 ou Comparador 2. Cada ponto de dados representa a média e.p.m. (n = 4-5 cada). As concentrações de anticorpos no soro foram monitoradas 1, 10, 20, 30 e 40 dias após a injeção utilizando um ELISA em sanduíche.

[060] A **Figura 5** mostra a porcentagem de hemólise x tempo em um ensaio de hemólise por via clássica do complemento *ex vivo* de anticorpos anti-C5 selecionados em camundongos humanizados para C5. Aos camundongos C5 humanizados foi administrada uma dose subcutânea de 15 mg/kg única de H4H12166P, Comparador 1 ou Comparador 2. Cada ponto de dados representa a média e.p.m. (n = 4-5 cada). A percentagem de hemólise no soro foi monitorada na pré-dose, 10, 20, 30, 40 e 50 dias após a injeção.% hemólise, calculada como uma relação de lise experimental vs máxima com% de lise de base subtraída de ambos os valores está relacionada com a quantidade de C5 inibida pelo anticorpo anti-C5 particular presente no soro em um dado momento.

[061] A **Figura 6** mostra a concentração sérica total versus os perfis de tempo de anticorpos anti-C5 selecionados em camundongos

humanizados para C5 (descritos no Exemplo 11 aqui). Administrou-se aos camundongos uma dose subcutânea de 15 mg/kg de controle de isótipo H4H12166P, H4H12161P, Comparador 1 ou IgG4P. Cada ponto de dados representa a média ± s.e.m. (n = 5 cada). Os níveis de anticorpos no soro foram monitorados 6 horas, 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 21, 30, 45 e 59 dias após a injeção utilizando um ELISA em sanduíche.

[062] A **Figura 7** é um gráfico que mostra pontuações de tomografia de coerência óptica (OCT) em camundongos tratados com controle de isótipo ou com anticorpo anti-C5 M1M17628N a 10 mg/kg ou 50 mg/kg (descrito no Exemplo 14). **** p <0,0001, tratamento ANOVA de duas vias com anticorpo anti-C5 a 50 mg/kg vs. nenhum tratamento ou tratamento com controle de isótipo.

[063] A **Figura 8** mostra a inibição da hemólise por via clássica pelo anticorpo anti-C5 M1M17628N na ausência de C3 (A); e na presença de 80 µg/mL de C3 humano (B) (descrito no Exemplo 14 aqui).

[064] A **Figura 9** mostra a contagem de *cluster* celular em camundongos humanizados C5 tratados com controle de isótipo ou com anticorpo C5 anti-humano H4H12170P a 10 mg/kg ou 50 mg/kg (descrito no Exemplo 15 aqui). n = 8-12 olhos para cada grupo

[065] A **Figura 10** é um gráfico mostrando os resultados de OCT em camundongos humanizados C5 tratados com controle de isótipo ou com anticorpo C5 anti-humano H4H12170P a 10 mg/kg ou 50 mg/kg (descrito em Exemplo 15 aqui). n = 8-12 olhos para cada grupo

[066] A **Figura 11** é um gráfico mostrando pontuações OCT em camundongos humanizados C5 tratados com controle de isótipo, anticorpo C4 anti-humano H5H12166P a 3 mg/kg ou 10 mg/kg, ou Comparador 2 a 10 mg/kg. n = 6-12 olhos para cada grupo (descrito no Exemplo 15).

[067] A **Figura 12** mostra a contagem de *cluster* celular em camundongos humanizados C5 tratados com controle de isótipo,

anticorpo C5 antihumano H4H12166P a 3 mg/kg ou 10 mg/kg, ou o Comparador 2 a 10 mg/kg. n = 6-12 olhos para cada grupo (descrito no Exemplo 15).

[068] A **Figura 13** é uma curva de sobrevivência de camundongos NZBWF1 tratados com controle de isótipo ou com anticorpos anti-C5 M1M17628N ou M1M17627N (aqui descritos no Exemplo 17).

[069] A **Figura 14** mostra os níveis de (A) albumina urinária e (B) albumina urinária normalizada para creatinina urinária em camundongos NZBWF1 tratados com controle de isótipo ou com anticorpos anti-C5 M1M17628N ou M1M17627N (descritos no Exemplo 17).

[070] A **Figura 15** mostra níveis de nitrogênio ureico no sangue em camundongos NZBWF1 tratados com controle de isótipo ou com anticorpos anti-C5 M1M17628N ou M1M17627N (descritos no Exemplo 17).

[071] A **Figura 16** é um gráfico que mostra a inibição da citotoxicidade dependente de anticorpo de astrócitos pelos anticorpos anti-C5 H4H12166P, H4H12170P, Comparador 1 e Comparador 2, como descrito no Exemplo 18.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[072] Antes de os métodos presentes serem descritos, deve ser entendido que esta invenção não está limitada a métodos particulares e condições experimentais descritas, uma vez que tais métodos e condições podem variar. É também para ser entendido que a terminologia usada aqui é para o propósito de descrever apenas modalidades particulares, e não pretende ser limitativa, uma vez que o escopo da presente invenção será limitado apenas pelas reivindicações anexas.

[073] A menos que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado que o

normalmente entendido por um especialista na técnica à qual esta invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos aqui descritos possam ser utilizados na prática ou teste da presente invenção, os métodos e materiais preferidos são agora descritos. Todas as publicações aqui mencionadas são aqui incorporadas como referência em sua totalidade.

Definições

[074] O termo "C5", também chamado de "componente 5 do complemento" ou "fator 5 do complemento" refere-se à proteína sérica da cascata do complemento. A proteína C5 é uma proteína de 1676 aminoácidos compreendendo duas cadeias alfa e beta. A proteína representa o ponto de convergência de três vias de ativação do complemento: via clássica, via alternativa e a via da lectina de ligação à manose. A sequência de aminoácidos da proteína C5 inteira é exemplificada pela sequência de aminoácidos fornecida no GenBank como número de acesso NP_001726.2 (SEQ ID NO: 355). O termo "C5" inclui proteína C5 recombinante ou seu fragmento. O termo também abrange a proteína C5 ou seu fragmento acoplado a, por exemplo, marcador de histidina, Fc de camundongo ou humano, ou uma sequência de sinal tal como ROR1. Por exemplo, o termo inclui sequências exemplificadas pela sequência apresentada na SEQ ID NO: 356 ou 357, compreendendo um marcador de histidina no terminal C, acoplado aos resíduos de aminoácidos 19 - 1676 da proteína C5 inteira. O termo também inclui variantes de proteína que compreendem um marcador de histidina no C-terminal, acoplado aos resíduos de aminoácidos 19 - 1676 da proteína C5 de comprimento total com uma alteração R885H ou uma alteração R885C.

[075] O termo "anticorpo", como usado aqui, pretende referir-se a moléculas de imunoglobulina compreendidas por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L)

interligadas por pontes dissulfeto (isto é, moléculas de anticorpo "), bem como seus multímeros (por exemplo, IgM) ou seus fragmentos de ligação ao antígeno. Cada cadeia pesada é constituída por uma região variável da cadeia pesada ("HCVR" ou "V_H") e uma região constante da cadeia pesada (compreendida pelos domínios C_H1, C_H2 e C_H3). Cada cadeia leve é composta por uma região variável da cadeia leve ("LCVR ou" V_L ") e uma região constante da cadeia leve (C_L). As regiões V_H e V_L podem ser ainda subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões estruturais (FR). Cada V_H e V_L é composta por três CDRs e quatro FR, dispostas a partir do terminal amino para o terminal carboxila na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Em certas modalidades da invenção, as FR do anticorpo (ou seu fragmento de ligação ao antígeno) podem ser idênticas às sequências da linhagem germinativa humana, ou podem ser modificadas naturalmente ou artificialmente. Uma sequência de consenso de aminoácidos pode ser definida com base em uma análise lado-a-lado de duas ou mais CDRs.

[076] A substituição de um ou mais resíduos de CDR ou a omissão de um ou mais CDRs também é possível. Anticorpos foram descritos na literatura científica em que um ou dois CDRs podem ser dispensados para ligação. Padlan *et al*. (1995, FASEB J. 9: 133-139) analisaram as regiões de contato entre os anticorpos e os seus antígenos, com base nas estruturas de cristais publicadas, e concluíram que apenas cerca de um quinto a um terço dos resíduos de CDR contatam de fato o antígeno. Padlan também encontrou muitos anticorpos nos quais uma ou duas CDRs não tinham aminoácidos em contato com um antígeno (veja, também, Vajdos *et al*. 2002 J Mol Biol 320: 415-428).

[077] Os resíduos de CDR que não contatam o antígeno podem ser identificados com base em estudos anteriores (por exemplo, os

resíduos H60-H65 em CDRH2 não são frequentemente requeridos), de regiões de CDRs de Kabat fora de CDRs de Chothia, por modelação molecular e/ou empiricamente. Se uma CDR ou resíduo (s) da mesma é omitida, é normalmente substituída com um aminoácido ocupando a posição correspondente em outra sequência de anticorpo humano ou um consenso de tais sequências. Posições para substituição dentro de CDRs e aminoácidos para substituir também podem ser selecionadas empiricamente. As substituições empíricas podem ser substituições conservativas ou não conservativas.

[078] Os anticorpos monoclonais anti-C5 totalmente humanos aqui descritos podem compreender uma ou mais substituições, inserções e/ou deleções de aminoácidos na estrutura e/ou regiões CDR dos domínios variáveis da cadeia pesada e leve em comparação com as sequências da linhagem germinativa correspondentes. Tais mutações podem ser facilmente determinadas comparando as sequências de aminoácidos aqui descritas com sequências germinais disponíveis, por exemplo, de bancos de dados de sequências de anticorpos públicos. A presente invenção inclui anticorpos e os seus fragmentos de ligação ao antígeno, que são derivados de qualquer uma das sequências de aminoácidos aqui descritas, em que um ou mais aminoácidos dentro de uma ou mais regiões estruturais e/ou CDR são mutados para os resíduos correspondentes (s) da sequência da linhagem germinativa a partir da qual o anticorpo foi derivado, ou do (s) resíduo (s) correspondente (s) de outra sequência da linhagem germinativa humana, ou a uma substituição conservativa de aminoácido do (s) resíduo (s) da linhagem germinativa correspondente (tais alterações de sequência são aqui referidas coletivamente como "mutações germinativas"). Uma pessoa de experiência ordinária na técnica, começando com as sequências da região variável da cadeia pesada e leve aqui descritas, pode facilmente produzir numerosos anticorpos e

fragmentos de ligação ao antígeno que compreendem uma ou mais mutações da linhagem germinativa individuais ou suas combinações. Em certas modalidades, todos os resíduos da estrutura e/ou CDR dentro dos domínios VH e/ou VL são mutados de volta para os resíduos encontrados na sequência da linhagem germinativa original a partir da qual o anticorpo foi derivado. Em outras modalidades, apenas certos resíduos são mutados de volta para a sequência da linhagem germinativa original, por exemplo, apenas os resíduos mutados encontrados nos primeiros 8 aminoácidos do FR1 ou nos últimos 8 aminoácidos do FR4, ou apenas os resíduos mutados encontrados no CDR1, CDR2 ou CDR3. Em outras modalidades, um ou mais dos resíduos estruturais e/ou CDR são mutados no (s) resíduo (s) correspondente (s) de uma sequência germinativa diferente (isto uma sequência da linhagem germinativa que diferente da sequência da linhagem germinativa a partir da qual o anticorpo foi originalmente derivado). Além disso, os anticorpos da presente invenção podem conter qualquer combinação de duas ou mais mutações da linhagem germinativa dentro da estrutura e/ou regiões CDR, por exemplo, em que certos resíduos individuais são mutados para o resíduo correspondente de uma determinada sequência da linhagem germinativa enquanto certos outros resíduos que diferem a partir da sequência da linhagem germinativa original são mantidos ou são mutados para o resíduo correspondente de uma sequência diferente da linhagem germinativa. Uma vez obtidos, os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno que contêm uma ou mais mutações germinativas podem ser facilmente testados para uma ou mais propriedades desejadas, como melhor especificidade de ligação, maior afinidade de ligação, propriedades biológicas antagonistas ou agonísticas melhoradas ou melhoradas (conforme o caso pode ser), imunogenicidade reduzida, etc. Anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno obtidos desta maneira geral estão

abrangidos dentro da presente invenção.

[079] A presente invenção também inclui anticorpos monoclonais anti-C5 totalmente humanos compreendendo variantes de qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCVR, LCVR e/ou CDR aqui descritas possuindo uma ou mais substituições conservativas. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos anti-C5 tendo sequências de aminoácidos HCVR, LCVR e/ou CDR com, por exemplo, 10 ou menos, 8 ou menos, 6 ou menos, 4 ou menos, etc. substituições de aminoácidos conservativas relativas a qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCVR, LCVR e/ou CDR aqui descritas.

[080] O termo "anticorpo humano", quando aqui utilizado, pretende incluir anticorpos possuindo regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana. Os mAbs humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou específica de sítios *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*), por exemplo nas CDR e em particular CDR3. Contudo, o termo "anticorpo humano", quando aqui utilizado, não pretende incluir mAbs nos quais sequências de CDR derivadas da linhagem germinativa de outra espécie de mamífero (por exemplo, camundongo) foram enxertadas em sequências FR humanas. O termo inclui anticorpos produzidos por via recombinante em um mamífero não humano, ou em células de um mamífero não humano. O termo não pretende incluir anticorpos isolados ou gerados em um indivíduo humano.

[081] O termo "recombinante", quando aqui usado, refere-se a anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno da invenção criados, expressos, isolados ou obtidos por tecnologias ou métodos conhecidos na técnica como tecnologia de DNA recombinante que incluem, por exemplo, entrelaçamento do DNA e expressão

transgênica. O termo refere-se a anticorpos expressos em um mamífero NO: humano (incluindo mamíferos transgênicos NO: humanos, por exemplo, camundongos transgênicos), ou em um sistema de expressão de células (por exemplo, células CHO) ou isolados de uma biblioteca de anticorpos humanos combinatoriais recombinantes.

[082] O termo "liga-se especificamente", ou "liga-se especificamente a", ou similar, significa que um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, forma um complexo com um antígeno que é relativamente estável sob condições fisiológicas. A ligação específica pode ser caracterizada por uma constante de dissociação de equilíbrio de pelo menos cerca de $1x10^{-8}$ M ou inferior (por exemplo, uma menor K_D indica uma ligação mais apertada). Os métodos para determinar se duas moléculas se ligam especificamente são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, diálise de equilíbrio, ressonância de plasmon de superfície e semelhantes. Como aqui descrito, os anticorpos foram identificados por ressonância de plasmon de superfície, por exemplo, BIACORE™, que se ligam especificamente a C5. Além disso, anticorpos multiespecíficos que se ligam a um domínio em C5 e um ou mais antígenos adicionais ou um biespecífico que se liga a duas regiões diferentes de C5 são, no entanto, considerados anticorpos que "ligam especificamente", quando aqui usados.

[083] O termo anticorpo de "alta afinidade" refere-se àqueles mAbs com uma afinidade de ligação a C5, expressa como K_D, de pelo menos 10^{-8} M; preferivelmente 10^{-9} M; mais preferivelmente 10^{-10} M, ainda mais preferivelmente 10^{-11} M, ainda mais preferivelmente 10^{-12} M, conforme medido por ressonância de plasmon de superfície, por exemplo, BIACORE™ ou ELISA por afinidade de solução.

[084] Pelo termo "taxa de desaceleração", "Koff" ou "kd" significa um anticorpo que se dissocia de C5, com uma constante de taxa de 1 x

10^{-3} s^{-1} ou menos, preferivelmente 1 x 10^{-4} s^{-1} ou menos, conforme determinado pela ressonância de plasmon de superfície, por exemplo, BIACORE™.

[085] Os termos "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo, "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo e semelhantes, tal quando aqui utilizado, incluem qualquer polipeptídeo ou glicoproteína de ocorrência natural, obtido enzimaticamente, sinteticamente ou geneticamente modificado que se ligue especificamente a um antígeno para formar um complexo. Os termos "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo, ou "fragmento de anticorpo", quando aqui utilizados, referem-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retêm a capacidade de se ligar à proteína C5.

[086] Em modalidades específicas, anticorpo ou fragmentos de anticorpo da invenção podem ser conjugados a uma porção desse ligante ou uma porção terapêutica ("imunoconjugado"), um segundo anticorpo anti-C5, ou qualquer outra porção terapêutica útil para tratar uma doença ou distúrbio associado a C5.

[087] Um "anticorpo isolado", quando aqui utilizado, pretende referir-se a um anticorpo que está substancialmente isento de outros anticorpos (Abs) possuindo especificidades antigênicas diferentes (por exemplo, um anticorpo isolado que se liga especificamente a C5, ou um fragmento adicional, está substancialmente isento de Abs que se ligam especificamente a antígenos que não C5.

[088] Um "anticorpo bloqueador" ou um "anticorpo neutralizante", quando aqui usado (ou um "anticorpo que neutraliza a atividade C5" ou "anticorpo antagonista"), refere-se a um anticorpo cuja ligação a C5 resulta na inibição de pelo menos uma atividade biológica de C5. Por exemplo, um anticorpo da invenção pode prevenir ou bloquear a hemólise mediada pelo complemento por via clássica ou via alternativa.

[089] O termo "ressonância de plasmon de superfície", quando

aqui usado, refere-se a um fenômeno óptico que permite a análise de interações biomoleculares em tempo real por detecção de alterações em concentrações de proteína dentro de uma matriz biossensora, por exemplo usando o sistema BIACORE ™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden e Piscataway, NJ).

[090] O termo "K_D", quando aqui utilizado, pretende referir-se à constante de dissociação de equilíbrio de uma interação anticorpo-antígeno particular.

[091] O termo "epítopo" refere-se a um determinante antigênico que interage com um sítio específico de ligação ao antígeno na região variável de uma molécula de anticorpo conhecida como parátopo. Um único antígeno pode ter mais de um epítopo. Assim, diferentes anticorpos podem se ligar a diferentes áreas de um antígeno e podem ter diferentes efeitos biológicos. O termo "epítopo" também se refere a um sítio em um antígeno ao qual as células B e/ou T respondem. Também se refere a uma região de um antígeno que é ligado por um anticorpo. Os epítopos podem ser definidos como estruturais ou funcionais. Os epítopos funcionais são geralmente um subconjunto dos epítopos estruturais e têm aqueles resíduos que contribuem diretamente para a afinidade da interação. Os epítopos podem também ser conformacionais, isto é, compostos de aminoácidos não lineares. Em certas modalidades, os epítopos podem incluir determinantes que são agrupamentos de superfície quimicamente ativos de moléculas tais como aminoácidos, cadeias laterais de açúcar, grupos fosforila ou grupos sulfonila e, em certas modalidades, podem ter características estruturais tridimensionais específicas e/ou características de carga específicas.

[092] O termo "competição cruzada", quando aqui usado, significa um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno deste se liga a um antígeno e inibe ou bloqueia a ligação de outro anticorpo ou

fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. O termo também inclui competição entre dois anticorpos em ambas as orientações, isto é, um primeiro anticorpo que se liga e bloqueia a ligação do segundo anticorpo e vice-versa. Em certas modalidades, o primeiro anticorpo e o segundo anticorpo podem ligar-se ao mesmo epítopo. Alternativamente, o primeiro e segundo anticorpos podem ligar-se a diferentes epítopos, mas sobreponíveis, de tal modo que a ligação de um inibe ou bloqueia a ligação do segundo anticorpo, por exemplo, através de impedimento estereoquímico. A competição cruzada entre anticorpos pode ser medida por métodos conhecidos na técnica, por exemplo, por um ensaio de interferometria de bio-camada sem rótulo em tempo real. A competição cruzada entre dois anticorpos pode ser expressa como a ligação do segundo anticorpo que é inferior ao sinal de base devido à ligação *self-self* (em que o primeiro e segundo anticorpos são o mesmo anticorpo). A competição cruzada entre 2 anticorpos pode ser expressa, por exemplo, como% de ligação do segundo anticorpo que é inferior à ligação de base da auto-substância de base (em que o primeiro e segundo anticorpos são o mesmo anticorpo).

[093] O termo "identidade substancial" ou "substancialmente idêntico", quando se refere a um ácido nucleico ou fragmento do mesmo, indica que, quando idealmente alinhado com inserções de nucleotídeos ou deleções apropriadas com outro ácido nucleico (ou sua cadeia complementar), há identidade da sequência nucleotídica em pelo menos cerca de 90%, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% das bases nucleotídicas, conforme medido por qualquer algoritmo bem conhecido de identidade de sequência, tal como FASTA, BLAST ou GAP, como discutido abaixo. Uma molécula de ácido nucleico tendo identidade substancial com uma molécula de ácido nucleico de referência pode, em certos casos, codificar um polipeptídeo possuindo a mesma ou substancialmente similar sequência de

aminoácidos que o polipeptídeo codificado pela molécula de ácido nucleico de referência.

[094] Conforme aplicado a polipeptídeos, o termo "similaridade substancial" ou "substancialmente similar" significa que duas sequências peptídicas, quando alinhadas de forma otimizada, como pelos programas GAP ou BESTFIT usando pesos de intervalo padrão, compartilham pelo menos 90% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos 95%, 98% ou 99% de identidade de sequência. De preferência, as posições de resíduos, que não são idênticas, diferem por substituições de aminoácidos conservativas. Uma "substituição conservativa de aminoácidos" é aquela em que um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido possuindo uma cadeia lateral (grupo R) com propriedades químicas semelhantes (por exemplo, carga ou hidrofobicidade). Em geral, uma substituição conservativa de aminoácidos não alterará substancialmente as propriedades funcionais de uma proteína. Nos casos em que duas ou mais sequências de aminoácidos diferem de cada outra por substituições conservativas, a porcentagem ou grau de similaridade pode ser ajustado para cima para corrigir a natureza conservativa da substituição. Os meios para fazer este ajustamento são bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Veja, por exemplo, Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331, que é aqui incorporado por referência. Exemplos de grupos de aminoácidos que possuem cadeias laterais com propriedades químicas semelhantes incluem 1) cadeias laterais alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadeias laterais de hidroxila alifática: serina e treonina; 3) cadeias laterais contendo amida: asparagina e glutamina; 4) cadeias laterais aromáticas: fenilalanina, tirosina e triptofano; 5) cadeias laterais básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadeias laterais ácidas: aspartato e glutamato, e 7) cadeias laterais contendo enxofre: cisteína e metionina. Os grupos

preferidos de substituição de aminoácidos conservativos são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato e asparagina-glutamina. Alternativamente, uma substituição conservativa é qualquer alteração que tenha um valor positivo na matriz de probabilidade de log PAM250 descrita em Gonnet *et al*. (1992) Science 256: 1443 45, aqui incorporado por referência. Uma substituição "moderadamente conservativa" é qualquer alteração que tenha um valor não-negativo na matriz de probabilidade de log do PAM250.

[095] A similaridade de sequência para polipeptídeos é tipicamente medida usando software de análise de sequência. O software de análise de proteínas combina sequências similares usando medidas de similaridade atribuídas a várias substituições, deleções e outras modificações, incluindo substituições conservativas de aminoácidos. Por exemplo, o software GCG contém programas tais como GAP e BESTFIT que podem ser utilizados com parâmetros padrão para determinar homologia de sequência ou identidade de sequência entre polipeptídeos intimamente relacionados, tais como polipeptídeos homólogos de diferentes espécies de organismos ou entre uma proteína de tipo selvagem e sua muteína. Veja, por exemplo, a versão 6.1 do GCG. As sequências polipeptídicas também podem ser comparadas utilizando FASTA com parâmetros predefinidos ou recomendados; um programa no GCG Versão 6.1. FASTA (por exemplo, FASTA2 e FASTA3) proporciona alinhamentos e percentagem de identidade de sequência das regiões da melhor sobreposição entre as sequências de dúvida e pesquisa (Pearson (2000) supra). Outro algoritmo preferido quando se compara uma sequência da invenção com uma base de dados contendo um grande número de sequências de organismos diferentes é o programa de computador BLAST, especialmente BLASTP ou TBLASTN, utilizando parâmetros por

defeito. Veja, por exemplo, Altschul *et al*. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 e (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, cada um dos quais é aqui incorporado por referência.

[096] A expressão "quantidade terapeuticamente eficaz" significa uma quantidade que produz o efeito desejado para o qual é administrada. A quantidade exata dependerá do objetivo do tratamento e será determinável por alguém versado na técnica utilizando técnicas conhecidas (veja, por exemplo, Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding).

[097] Quando aqui usado, o termo "indivíduo" refere-se a um animal, preferivelmente um mamífero, mais preferivelmente um humano, com necessidade de melhoria, prevenção e/ou tratamento de uma doença ou distúrbio associado a C5 tal como síndrome urêmica hemolítica atípica (aHUS) ou hemoglobinúria paroxística noturna (PNH). O termo inclui seres humanos que têm ou estão em risco de ter tal doença ou distúrbio.

[098] Quando aqui usado, os termos "tratar", "tratando" ou "tratamento" referem-se à redução ou melhoria da gravidade de pelo menos um sintoma ou indicação de uma doença ou distúrbio associado ao C5 devido à administração de um agente terapêutico, tal como um anticorpo da presente invenção, a um indivíduo em necessidade disto. Os termos incluem inibição da progressão da doença ou de agravamento de um sintoma/indicação. Os termos também incluem prognóstico positivo da doença, isto é, o indivíduo pode estar isento de doença ou pode ter doença reduzida quando da administração de um agente terapêutico, tal como um anticorpo da presente invenção. O agente terapêutico pode ser administrado a uma dose terapêutica ao indivíduo.

[099] Os termos "prevenir", "prevenindo" ou "prevenção" referem-se à inibição da manifestação de uma doença ou distúrbio associado ao

C5 ou quaisquer sintomas ou indicações de tal doença ou distúrbio na administração de um anticorpo da presente invenção.

Fragmentos de Anticorpos de Ligação ao antígeno

[0100] Salvo indicação em contrário específica, o termo "anticorpo", quando aqui utilizado, deve compreender moléculas de anticorpo compreendendo duas cadeias pesadas de imunoglobulina e duas cadeias leves de imunoglobulina (isto é, "moléculas completas de anticorpo") bem como seus fragmentos de ligação ao antígeno. Os termos "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo, "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo e semelhantes, tal quando aqui utilizados, incluem qualquer de ocorrência natural, obtido enzimaticamente, sintetizado ou geneticamente manipulado polipeptídeo ou glicoproteína que se liga especificamente a um antígeno para formar um complexo. O termo "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo, ou "fragmento de anticorpo", quando aqui usado, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retêm a capacidade de se ligar especificamente à proteína C5. Um fragmento de anticorpo pode incluir um fragmento Fab, um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento Fv, um fragmento dAb, um fragmento contendo uma CDR ou uma CDR isolada. Em certas modalidades, o termo "fragmento de ligação ao antígeno" refere-se a um fragmento polipeptídico de uma molécula de ligação ao antígeno específica. Os fragmentos de ligação ao antígeno de um anticorpo podem ser derivados, por exemplo, de moléculas de anticorpo completas utilizando quaisquer técnicas padrão adequadas tais como digestão proteolítica ou técnicas de engenharia genética recombinante envolvendo a manipulação e expressão de DNA codificando variável de anticorpo e (opcionalmente) domínios constantes. Tal DNA é conhecido e/ou está facilmente disponível a partir de, por exemplo, fontes comerciais, bibliotecas de DNA (incluindo, por exemplo, bibliotecas de fago-anticorpo), ou pode ser sintetizado. O DNA

pode ser sequenciado e manipulado quimicamente ou utilizando técnicas de biologia molecular, por exemplo, para organizar um ou mais domínios variáveis e/ou constantes em uma configuração adequada, ou para introduzir códons, criar resíduos de cisteína, modificar, adicionar ou eliminar aminoácidos, etc.

[0101] Exemplos não limitantes de fragmentos de ligação ao antígeno incluem: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos $F(ab')_2$; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas Fv de cadeia simples (scFv); (vi) fragmentos de dAb; e (vii) unidades de reconhecimento mínimo que consistem nos resíduos de aminoácidos que mimetizam a região hipervariável de um anticorpo (por exemplo, uma região determinante de complementaridade isolada (CDR) tal como um peptídeo CDR3), ou um peptídeo FR3-CDR3-FR4 restringido. Outras moléculas manipuladas, como anticorpos específicos de domínio, anticorpos de domínio único, anticorpos com domínio excluído, anticorpos quiméricos, anticorpos enxertados com CDR, diacorpos, triacorpos, tetrabodies, minicorpos, nanocorpos (por exemplo, nanocorpos monovalentes, nanocorpos bivalentes, etc.), pequenos imunofarmacêuticos modulares (SMIPs), e domínios IgNAR variáveis de tubarão, também estão englobados na expressão "fragmento de ligação ao antígeno", quando aqui usado.

[0102] Um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo compreenderá tipicamente pelo menos um domínio variável. O domínio variável pode ser de qualquer tamanho ou composição de aminoácidos e compreender geralmente pelo menos uma CDR, que está adjacente ou enquadrada com uma ou mais sequências estruturais. Nos fragmentos de ligação ao antígeno com um domínio V_H associado a um domínio V_L, os domínios V_H e V_L podem estar situados um em relação ao outro em qualquer disposição adequada. Por exemplo, a região variável pode ser dimérica e conter dímeros V_H - V_H, V_H - V_L ou V_L - V_L.

Alternativamente, o fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo pode conter um domínio monomérico de V_H ou V_L.

[0103] Em certas modalidades, um fragmento de ligação a um antígeno de um anticorpo pode conter pelo menos um domínio variável ligado covalentemente a pelo menos um domínio constante. Configurações exemplares não limitantes, exemplares de domínios variáveis e constantes que podem ser encontradas dentro de um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo da presente invenção incluem: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-CL; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; e (xiv) V_L-CL. Em qualquer configuração de domínios variáveis e constantes, incluindo qualquer das configurações exemplares listadas acima, os domínios variável e constante podem estar diretamente ligados uns aos outros ou podem estar ligados por uma região de articulação ou de ligação completa ou parcial. Uma região de articulação pode consistir em pelo menos 2 (por exemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 ou mais) aminoácidos, que resultam em uma ligação flexível ou semiflexível entre variáveis adjacentes e/ou domínios constantes em uma única molécula polipeptídica. Além disso, um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo da presente invenção pode compreender um homodímero ou heterodímero (ou outro multímero) de qualquer uma das configurações de domínio variável e constante listadas acima em associação não covalente entre si e/ou com um ou mais domínios monoméricos de V_H ou V_L (por exemplo, por ligação (ões) dissulfeto (s)).

[0104] Tal como com as moléculas de anticorpo completas, os fragmentos de ligação ao antígeno podem ser monoespecíficos ou multiespecíficos (por exemplo, biespecíficos). Um fragmento multiespecífico de ligação ao antígeno de um anticorpo compreenderá tipicamente pelo menos dois domínios variáveis diferentes, em que cada

domínio variável é capaz de se ligar especificamente a um antígeno separado ou a um epítopo diferente no mesmo antígeno. Qualquer formato de anticorpo multiespecífico, incluindo os formatos de anticorpos biespecíficos exemplares aqui descritos, pode ser adaptado para utilização no contexto de um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo da presente invenção utilizando técnicas de rotina disponíveis na técnica.

Preparação de Anticorpos Humanos

[0105] Métodos para gerar anticorpos humanos em camundongos transgênicos são conhecidos na técnica. Quaisquer desses métodos conhecidos podem ser utilizados no contexto da presente invenção para produzir anticorpos humanos que se liguem especificamente à proteína C5.

[0106] Um imunógeno compreendendo qualquer um dos seguintes pode ser utilizado para gerar anticorpos para a proteína C5. Em certas modalidades, os anticorpos da invenção são obtidos de camundongos imunizados com uma proteína C5 nativa de comprimento completo (veja, por exemplo, número de acesso no GenBank NP_001726.2) (SEQ ID N 355), ou com DNA que codifica a proteína ou fragmento do mesmo. Alternativamente, a proteína ou seu fragmento pode ser produzida utilizando técnicas bioquímicas convencionais e modificadas e utilizadas como imunógeno. Em certas modalidades da invenção, o imunógeno é um fragmento da proteína C5 que varia de cerca dos resíduos de aminoácidos 19 - 1676 da SEQ ID NO: 355.

[0107] Em algumas modalidades, o imunógeno pode ser uma proteína C5 recombinante ou seu fragmento expresso em *E. coli* ou em quaisquer outras células eucarióticas ou de mamífero, tais como células de ovário de hamster Chinês (CHO).

[0108] Utilizando a tecnologia VELOCIMMUNE® (veja, por exemplo, US 6.596.541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE)

ou qualquer outro método conhecido para gerar anticorpos monoclonais, anticorpos quiméricos de alta afinidade para C5 são inicialmente isolados tendo uma região variável humana e uma região constante de camundongo. A tecnologia VELOCIMMUNE envolve a geração de um camundongo transgênico com um genoma compreendendo regiões variáveis de cadeia pesada e leve humanas operacionalmente ligadas a locais de região constante de camundongo endógenos, de tal modo que o camundongo produza um anticorpo compreendendo uma região variável humana e uma região constante de camundongo em resposta a uma estimulação antigênica. O DNA que codifica as regiões variáveis das cadeias pesadas e leves do anticorpo está isolado e operacionalmente ligado ao DNA que codifica as regiões constantes da cadeia pesada e leve humanas. O DNA é então expresso em uma célula capaz de expressar o anticorpo totalmente humano.

[0109] Geralmente, um camundongo VELOCIMMUNE® é desafiado com o antígeno de interesse e as células linfáticas (tais como as células B) são recuperadas dos camundongos que expressam anticorpos. As células linfáticas podem ser fundidas com uma linhagem celular de mieloma para preparar linhagens celulares de hibridoma imortal, e essas linhagens celulares de hibridoma são rastreadas e selecionadas para identificar linhagens celulares de hibridoma que produzem anticorpos específicos para o antígeno de interesse. O DNA que codifica as regiões variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve pode ser isolado e ligado a regiões constantes isotípicas desejáveis da cadeia pesada e da cadeia leve. Uma tal proteína de anticorpo pode ser produzida em uma célula, tal como uma célula CHO. Alternativamente, o DNA que codifica os anticorpos químicos específicos do antígeno ou os domínios variáveis das cadeias leves e pesadas podem ser isolados diretamente a partir de linfócitos específicos do antígeno.

[0110] Inicialmente, anticorpos quiméricos de alta afinidade são

isolados com uma região variável humana e uma região constante do camundongo. Tal como na seção experimental abaixo, os anticorpos são caracterizados e selecionados para características desejáveis, incluindo afinidade, seletividade, epítopo, etc. As regiões constantes de camundongo são substituídas por uma região constante humana desejada para gerar o anticorpo totalmente humano da invenção, por exemplo, tipo selvagem ou IgG1 ou IgG4 modificado. Embora a região constante selecionada possa variar de acordo com o uso específico, as características de ligação ao antígeno de alta afinidade e especificidade de alvo residem na região variável.

Bioequivalentes

[0111] Os anticorpos anti-C5 e os fragmentos de anticorpo da presente invenção abrangem proteínas com sequências de aminoácidos que variam daquelas dos anticorpos descritos, mas que retêm a capacidade de se ligarem à proteína C5. Tais anticorpos variantes e fragmentos de anticorpo compreendem uma ou mais adições, deleções ou substituições de aminoácidos quando comparados com a sequência parental, mas exibem atividade biológica que é essencialmente equivalente à dos anticorpos descritos. Do mesmo modo, as sequências de DNA que codificam anticorpos da presente invenção abrangem sequências que compreendem uma ou mais adies, deleções ou substituições de nucleotídeos quando comparadas com a sequência descrita, mas que codificam um anticorpo ou fragmento de anticorpo que é essencialmente bioequivalente a um anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção.

[0112] Duas proteínas de ligação ao antígeno, ou anticorpos, são consideradas bioequivalentes se, por exemplo, forem equivalentes farmacêuticos ou alternativas farmacêuticas cuja taxa e extensão de absorção não mostram uma diferença significativa quando administrados na mesma dose molar em condições experimentais

semelhantes, dose única ou doses múltiplas. Alguns anticorpos serão considerados equivalentes ou alternativas farmacêuticas se forem equivalentes na extensão da sua absorção mas não na sua taxa de absorção e ainda assim puderem ser considerados bioequivalentes porque tais diferenças na taxa de absorção são intencionais e são refletidas na rotulagem, não são essenciais para a obtenção de medicamentos corporais eficazes as concentrações acima, por exemplo, o uso crônico, e são consideradas clinicamente insignificantes para o medicamento particular estudado.

[0113] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação ao antígeno são bioequivalentes se não existirem diferenças clinicamente significativas na sua segurança, pureza ou potência.

[0114] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação ao antígeno são bioequivalentes se um paciente puder ser comutado uma ou mais vezes entre o produto de referência e o produto biológico sem um aumento esperado no risco de efeitos adversos, incluindo uma alteração clinicamente significativa na imunogenicidade ou diminuída eficácia, em comparação com a continuação da terapia sem tal troca.

[0115] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação ao antígeno são bioequivalentes se ambas atuam por um mecanismo ou mecanismos de ação comuns para a condição ou condições de utilização, na medida em que tais mecanismos são conhecidos.

[0116] A bioequivalência pode ser demonstrada pelos métodos *in vivo* e/ou *in vitro*. Medições de bioequivalência incluem, por exemplo, (a) um teste *in vivo* em seres humanos ou outros mamíferos, em que a concentração do anticorpo ou dos seus metabólitos é medida no sangue, plasma, soro ou outro fluido biológico em função do tempo; (b) um teste *in vitro* que foi correlacionado com e é razoavelmente previsível de dados de biodisponibilidade *in vivo* em seres humanos; c) Um teste *in vivo* em seres humanos ou outros mamíferos em que o efeito

farmacológico agudo apropriado do anticorpo (ou do seu alvo) é medido em função do tempo; e (d) em um ensaio clínico bem controlado que estabeleça segurança, eficácia ou biodisponibilidade ou bioequivalência de um anticorpo.

[0117] Variantes bioequivalentes dos anticorpos da invenção podem ser construídas, por exemplo, fazendo várias substituições de resíduos ou sequências ou eliminando resíduos ou sequências terminais ou internos não necessários para a atividade biológica. Por exemplo, resíduos de cisteína não essenciais para a atividade biológica podem ser eliminados ou substituídos por outros aminoácidos para prevenir a formação de pontes dissulfeto intramoleculares desnecessárias ou incorretas por renaturação. Em outros contextos, os anticorpos bioequivalentes podem incluir variantes de anticorpo compreendendo alterações de aminoácidos, que modificam as características de glicosilação dos anticorpos, por exemplo, mutações que eliminam ou removem a glicosilação.

Anticorpos Anti-C5 Compreendendo Variantes Fc

[0118] De acordo com certas modalidades da presente invenção, são fornecidos anticorpos anti-C5 compreendendo um domínio Fc compreendendo uma ou mais mutações que aumentam ou diminuem a ligação do anticorpo ao receptor FcRn, por exemplo, o pH ácido em comparação com o pH neutro. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos anti-C5 compreendendo uma mutação na região C_H2 ou C_H3 do domínio Fc, em que a (s) mutação (ões) aumenta(m) a afinidade do domínio Fc para FcRn em um ambiente ácido (por exemplo, em um endossoma onde o pH varia de cerca de 5,5 a cerca de 6,0). Tais mutações podem resultar em um aumento da meia-vida no soro do anticorpo quando administrado a um animal. Exemplos não limitantes de tais modificações de Fc incluem, por exemplo, uma modificação na posição 250 (por exemplo, E ou Q); 250 e 428 (por exemplo, L ou F);

252 (por exemplo, L/Y/F/W ou T), 254 (por exemplo, são ou T) e 256 (por exemplo, são/R/Q/E/D ou T); ou uma modificação na posição 428 e/ou 433 (por exemplo, H/L/R/são/P/Q ou K) e/ou 434 (por exemplo, A, W, H, F ou Y [N434A, N434W, N434H, N434F ou N434Y]); ou uma modificação na posição 250 e/ou 428; ou uma modificação na posição 307 ou 308 (por exemplo, 308F, V308F) e 434. Em uma modalidade, a modificação compreende uma modificação de 428L (por exemplo, M428L) e 434S (por exemplo, N434S); uma modificação de 428L, 259I (por exemplo, V259I) e 308F (por exemplo, V308F); uma modificação 433K (por exemplo, H433K) e 434 (por exemplo, 434Y); uma modificação 252, 254 e 256 (por exemplo, 252Y, 254T e 256E); uma modificação de 250Q e 428L (por exemplo, T250Q e M428L); e uma modificação 307 e/ou 308 (por exemplo, 308F ou 308P). Ainda em outra modalidade, a modificação compreende uma modificação 265A (por exemplo, D265A) e/ou 297A (por exemplo, N297A).

[0119] Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos anti-C5 compreendendo um domínio Fc compreendendo um ou mais pares ou grupos de mutações selecionados do grupo consistindo em: 250Q e 248L (e. G., T250Q e M248L); 252Y, 254T e 256E (por exemplo, M252Y, S254T e T256E); 428L e 434S (por exemplo, M428L e N434S); 257I e 311I (por exemplo, P257I e Q311I); 257I e 434H (por exemplo, P257I e N434H); 376V e 434H (por exemplo, D376V e N434H); 307A, 380A e 434A (por exemplo, T307A, E380A e N434A); e 433K e 434F (por exemplo, H433K e N434F). Todas as combinações possíveis das mutações do domínio Fc precedentes e outras mutações dentro dos domínios variáveis do anticorpo aqui descritos, estão contempladas no escopo da presente invenção.

[0120] A presente invenção também inclui anticorpos anti-C5 compreendendo uma região (C_H) constante da cadeia pesada quimérica, em que a região C_H quimérica compreende segmentos

derivados das regiões C_H de mais de um isótipo de imunoglobulina. Por exemplo, os anticorpos da invenção podem compreender uma região C_H quimérica compreendendo parte ou todo o domínio C_H2 derivado de uma molécula de IgG1 humana, IgG2 humana ou IgG4 humana, combinada com parte ou todo o domínio C_H3 derivado de uma molécula IgG1 humana, IgG2 humana ou IgG4 humana. De acordo com certas modalidades, os anticorpos da invenção compreendem uma região C_H quimérica possuindo uma região de articulação quimérica. Por exemplo, uma articulação quimérica pode compreender uma sequência de aminoácidos "articulação superior" (resíduos de aminoácido das posições 216 a 227 de acordo com a numeração EU) derivada de uma região de articulação IgG1 humana, IgG2 humana ou IgG4 humana, combinada com sequência de "articulação inferior" (resíduos de aminoácidos das posições 228 a 236 de acordo com a numeração EU) derivada de uma região de articulação IgG1 humana, uma IgG2 humana ou uma IgG4 humana. De acordo com certas modalidades, a região de articulação quimérica compreende resíduos de aminoácidos derivados de uma articulação superior de IgG1 humana ou de uma articulação superior de IgG4 humana e resíduos de aminoácido derivados de uma articulação inferior de IgG2 humana. Um anticorpo compreendendo uma região C_H química como aqui descrito pode, em certas modalidades, exibir funções efetoras Fc modificadas sem afetar adversamente as propriedades terapêuticas ou farmacocinéticas do anticorpo. (Veja, por exemplo, Publicação de Pedido de Patente U.S. 2014/0243504, cuja descrição é aqui incorporada por referência na sua totalidade).

Características Biológicas dos Anticorpos

[0121] Em geral, os anticorpos da presente invenção funcionam ligando-se à proteína C5 e impedindo a sua clivagem para C5a e C5b. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos que ligam a proteína C5 (por exemplo,

a 25°C ou a 37°C) com uma K_D inferior a 9 nM medido por ressonância de plasmon de superfície, por exemplo, usando o formato do ensaio conforme definido no Exemplo 3 aqui. Em certas modalidades, os anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno ligam C5 com uma K_D inferior a cerca de 9 nM, inferior a cerca de 5 nM, inferior a cerca de 2 nM, inferior a cerca de 1 nM, inferior a cerca de 500 pM, inferior a 250 pM ou inferior a 100 pM, tal como medido por ressonância de plasmon de superfície, por exemplo, utilizando o formato de ensaio como definido no Exemplo 3 aqui, ou um ensaio substancialmente semelhante.

[0122] A presente invenção também inclui anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam à proteína C5 humana com uma meia-vida dissociativa (t½) maior que cerca de 2 minutos, medida por ressonância de plasmon de superfície a 25 ºC, por exemplo, usando um formato de ensaio tal como definido no Exemplo 4, ou um ensaio substancialmente semelhante. Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da presente invenção ligam a proteína C5 com uma t½ maior que cerca de 5 minutos, superior a cerca de 10 minutos, superior a cerca de 30 minutos, superior a cerca de 50 minutos, superior a cerca de 100 minutos, superior a cerca de 150 minutos, superior a cerca de 200 minutos, ou superior a cerca de 250 minutos, medido por ressonância de plasmon de superfície a 25 ºC, por exemplo, utilizando um formato de ensaio tal como definido no Exemplo 3 (por exemplo, captura de mAb ou formato de captura de antígeno), ou um ensaio substancialmente similar.

[0123] A presente invenção também inclui anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam à proteína C5 humana com uma meia-vida dissociativa (t½) maior que cerca de 1,5 minutos, medida por ressonância de plasmon de superfície a 37 ºC, por exemplo, usando um formato de ensaio tal como definido no Exemplo 4, ou um

ensaio substancialmente semelhante. Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da presente invenção ligam a proteína C5 com uma t½ superior a cerca de 2 minutos, superior a cerca de 5 minutos, superior a cerca de 10 minutos, superior a cerca de 25 minutos superior a cerca de 50 minutos, superior a cerca de 100 minutos, superior a cerca de 150 minutos, ou superior a cerca de 200 minutos, medida por ressonância de plasmon de superfície a 37 ºC, por exemplo, utilizando um formato de ensaio como definido no Exemplo 3 (por exemplo, captura de mAb ou formato de captura de antígeno), ou um ensaio substancialmente semelhante.

[0124] A presente invenção também inclui anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos que ligam a proteína C5 de macaco (por exemplo, a 25°C ou a 37°C) com uma K_D inferior a 120 nM medida por ressonância de plasmon de superfície, por exemplo, usando o formato de ensaio como definido no Exemplo 3 aqui. Em certas modalidades, os anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno ligam o C5 de macaco com uma K_D inferior a cerca de 120 nM, inferior a cerca de 100 nM, inferior a cerca de 50 nM, inferior a cerca de 25 nM, inferior a cerca de 10 nM, inferior a cerca de 5 nM de cerca de 1 nM, inferior a cerca de 500 pM ou inferior a 250 pM, tal como medida pela ressonância de plasmon de superfície, por exemplo, utilizando o formato de ensaio como aqui definido no Exemplo 3, ou um ensaio substancialmente semelhante.

[0125] A presente invenção também inclui anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos que ligam proteína C5 humana modificada com alteração R885H (exemplificada por SEQ ID NO: 356) com uma K_D inferior a 70 nM medida por ressonância de plasmon de superfície, por exemplo, usando o formato de ensaio como definido no Exemplo 3 aqui. As variantes de C5 mostraram uma resposta fraca aos anticorpos anti-C5 anteriormente descritos na técnica (por exemplo,

Nishimura *et al*., 2014, New Engl. J. Med. 370: 632-639). Em certas modalidades, os anticorpos ou os seus fragmentos de ligação ao antígeno ligam o C5 humano modificado com uma K_D inferior a cerca de 65 nM, inferior a cerca de 50 nM, inferior a cerca de 20 nM, inferior a cerca de 10 nM, inferior a cerca de 5 nM, inferior a cerca de 3nM ou inferior a 2 nM, tal como medido por ressonância de plasmon de superfície, por exemplo, utilizando o formato de ensaio como aqui definido no Exemplo 3, ou um ensaio substancialmente similar.

[0126] A presente invenção também inclui anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos que ligam proteína C5 humana modificada com alteração R885C (exemplificada por SEQ ID NO: 357) com uma K_D inferior a 160 nM medido por ressonância de plasmon de superfície, por exemplo, utilizando o formato de ensaio como definido no Exemplo 3 aqui. As variantes de C5 mostraram uma resposta fraca aos anticorpos anti-C5 anteriormente descritos na técnica (por exemplo, Nishimura *et al*., 2014, New Engl. J. Med. 370: 632-639). Em certas modalidades, os anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno ligam o C5 humano modificado com uma K_D inferior a cerca de 150 nM, inferior a cerca de 100 nM, inferior a cerca de 50 nM, inferior a cerca de 20 nM, inferior a cerca de 10 nM, inferior a cerca de 5 nM ou inferior a 2 nM, tal como medido por ressonância de plasmon de superfície, por exemplo, utilizando o formato de ensaio como aqui definido no Exemplo 3, ou um ensaio substancialmente similar.

[0127] A presente invenção também inclui anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos que inibem a citotoxicidade dependente de complemento (CDC) com IC_{50} menor que 10 nM conforme medido por um ensaio de luminescência, por exemplo, usando o formato de ensaio como definido no Exemplo 6. Em certas modalidades, os anticorpos ou os seus fragmentos de ligação ao antígeno inibem CDC com IC_{50} inferior a cerca de 5 nM, inferior a cerca

de 3,5 nM ou inferior a cerca de 2 nM, conforme medido por um ensaio de luminescência de células B, por exemplo, utilizando o formato de ensaio aqui definido no Exemplo 6, ou um ensaio substancialmente similar.

[0128] A presente invenção também inclui anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno que bloqueiam a hemólise por via clássica (CP) mediada por C5 em mais de 94% e com uma IC_{50} menor que 6nM, conforme medido por um ensaio de hemólise por CP, por exemplo, usando o formato de ensaio como definido no Exemplo 8 aqui. Em certas modalidades, os anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno bloqueiam a hemólise por CP com IC_{50} inferior a cerca de 6nM, inferior a cerca de 5 nM, inferior a cerca de 4nM, inferior a cerca de 3nM ou inferior a cerca de 2nM, medida pelo ensaio de hemólise por CP, por exemplo, utilizando o formato de ensaio como definido no Exemplo 8, ou um ensaio substancialmente similar.

[0129] A presente invenção também inclui anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno que bloqueiam hemólise por via alternativa mediada por C5 humana (AP) em mais de 70% e com uma IC_{50} menor que 165 nM, conforme medido por um ensaio de hemólise por AP, por exemplo, usando o formato de ensaio como definido no Exemplo 8 aqui. Em certas modalidades, os anticorpos ou os seus fragmentos de ligação ao antígeno bloqueiam a hemólise por AP com IC_{50} inferior a cerca de 160 nM, inferior a cerca de 150 nM, inferior a cerca de 100 nM, inferior a cerca de 50 nM ou inferior a cerca de 20 nM, medida pelo ensaio de hemólise por AP, por exemplo, utilizando o formato de ensaio como definido no Exemplo 8, ou um ensaio substancialmente similar.

[0130] A presente invenção também inclui anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno que bloqueiam a hemólise por via clássica (CP) mediada por C5 de macaco verde africano em mais de 40% e com uma IC_{50} menor que 185 nM, conforme medido por um ensaio de hemólise

por CP, por exemplo, usando o formato de ensaio como definido no Exemplo 8 aqui. Em certas modalidades, os anticorpos ou os seus fragmentos de ligação ao antígeno bloqueiam a hemólise por CP com IC_{50} inferior a cerca de 180 nM, inferior a cerca de 150 nM, inferior a cerca de 100 nM, inferior a cerca de 75 nM ou inferior a cerca de 50 nM, medida pelo ensaio de hemólise por CP, por exemplo, utilizando o formato de ensaio como definido no Exemplo 8, ou um ensaio substancialmente similar.

[0131] A presente invenção também inclui anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno que bloqueiam hemólise por via alternativa mediada por C5 de macaco verde africano com uma IC_{50} menor que 235 nM, conforme medido por um ensaio de hemólise por AP, por exemplo, usando o formato do ensaio como definido no Exemplo 8 aqui. Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno bloqueiam a hemólise por AP com IC_{50} inferior a cerca de 200 nM, inferior a cerca de 150 nM, inferior a cerca de 100 nM, inferior a cerca de 50 nM ou inferior a cerca de 20 nM, medida pelo ensaio de hemólise por AP, por exemplo, utilizando o formato de ensaio como definido no Exemplo 8, ou um ensaio substancialmente similar.

[0132] A presente invenção também inclui anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno que bloqueiam mais de 90% da hemólise por via clássica (CP) mediada por C5 de macaco cynomolgus com uma IC_{50} menor que 145 nM, conforme medido por um ensaio de hemólise por CP, por exemplo, usando o formato de ensaio como definido no Exemplo 8 aqui. Em certas modalidades, os anticorpos ou os seus fragmentos de ligação ao antígeno bloquear hemólise por CP com IC_{50} menor que cerca de 140 nM, menor que cerca de 120 nM, menor que cerca de 100 nM, menor que cerca de 75 nM, ou menor que cerca de 50 nM, conforme medido pelo ensaio de hemólise por CP, por exemplo, usando o formato de ensaio como definido no Exemplo 8 aqui ou um

ensaio substancialmente semelhante.

[0133] A presente invenção também inclui anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno que bloqueiam a hemólise por via alternativa mediada por C5 de macaco cynomolgus (AP) com uma IC_{50} menor que 30 nM, conforme medido por um ensaio de hemólise por AP, por exemplo, usando o formato de ensaio conforme definido no Exemplo 8 aqui. Em certas modalidades, os anticorpos ou os seus fragmentos de ligação ao antígeno bloqueiam a hemólise por AP com IC_{50} inferior a cerca de 25 nM, inferior a cerca de 20 nM, inferior a cerca de 10 nM, inferior a cerca de 5 nM ou inferior a cerca de 2 nM, medida pelo ensaio de hemólise por AP, por exemplo, utilizando o formato de ensaio como definido no Exemplo 8, ou um ensaio substancialmente similar.

[0134] A presente invenção também inclui anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno que apresentam propriedades farmacocinéticas (PK) e farmacodinâmicas (PD) melhoradas em comparação com anticorpos anti-C5 na técnica. Os anticorpos anti-C5 da presente invenção apresentam menor susceptibilidade à depuração mediada pelo alvo após administração, como mostrado nos Exemplos 9 e 10 da presente invenção. Em certas modalidades, a presente invenção inclui anticorpos anti-C5 e seus fragmentos de ligação ao antígeno que mostram concentrações séricas por períodos prolongados, por exemplo, mais de 20 dias, mais de 25 dias, mais de 30 dias, mais de 35 dias 40 dias, mais de 45 dias, mais de 50 dias, mais de 55 dias, ou mais de 60 dias, como descrito nos Exemplos 9 e 10 da presente invenção. Em certas modalidades, os anticorpos anti-C5 da presente invenção mostram uma meia-vida no soro prolongada de mais de 10 dias, em comparação com anticorpos anti-C5 na técnica.

[0135] Em certas modalidades, a presente invenção fornece anticorpos anti-C5 e seus fragmentos de ligação ao antígeno que têm alta afinidade para C5 humano (por exemplo, K_D menor que 0,3nM) e

uma depuração mais baixa (por exemplo, meia-vida sérica estendida, atividade farmacodinâmica melhorada ao longo de mais dias do que os anticorpos anti-C5 previamente conhecidos). Tais anticorpos da presente invenção podem ser vantajosamente utilizados com dosagem menos frequente em um indivíduo com uma doença ou distúrbio associado a C5.

[0136] Em uma modalidade, a presente invenção proporciona um anticorpo recombinante isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente à proteína C5, em que o anticorpo ou seu fragmento exibe uma ou mais das seguintes características: (a) é um anticorpo monoclonal totalmente humano; (b) liga-se ao C5 humano com uma constante de dissociação (K_D) inferior a 0,9 nM a 25°C, conforme medido em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície; (c) liga-se ao C5 humano com uma K_D inferior a 0,3 nM a 37°C, conforme medido em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície; (d) tem concentração sérica de mais do que 10 µg/mL até ao dia 70 após administração ao macaco cynomolgus; (e) bloqueia a hemólise por CP e AP ao dia 35 após administração ao macaco cynomolgus, conforme medido em um ensaio de hemólise *ex vivo*; (f) tem uma meia-vida no soro de mais de 10 dias em macaco cynomolgus; (g) tem concentração sérica de mais de 10 µg/mL até ao dia 40 após administração a camundongos humanizados C5; (h) bloqueia a hemólise por CP até ao dia 30 após administração a camundongos humanizados em C5, conforme medido em um ensaio de hemólise *ex vivo*; e (i) tem uma meia-vida no soro de mais de 10 dias em camundongos humanizados com C5.

[0137] Em uma modalidade, a presente invenção proporciona um anticorpo recombinante isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente à proteína C5, em que o anticorpo ou seu fragmento apresenta uma ou mais das seguintes características:

(a) um anticorpo monoclonal totalmente humano; (b) liga-se ao C5 humano com uma constante de dissociação (K_D) inferior a 0,9 nM a 25°C, conforme medido em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície; (c) liga-se ao C5 humano com uma K_D inferior a 0,3 nM a 37°C, conforme medido em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície; (d) liga-se ao C5 de macaco com uma K_D inferior a 65 nM, conforme medido em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície; (e) liga-se à variante C5 humana R885H (SEQ ID NO: 356) com uma K_D inferior a 0,5 nM, conforme medido em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície; (f) liga-se à variante C5 humana R885C (SEQ ID NO: 357) com uma K_D inferior a 0,5 nM, conforme medido em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície; (g) bloqueia a hemólise por via clássica (PC) mediada por C5 humana em mais de 95% e com IC_{50} inferior a 6 nM, conforme medido em um ensaio de hemólise por CP; (h) bloqueia a hemólise por via alternativa mediada por C5 humana (AP) em mais de 70% e com IC_{50} inferior a 165 nM, conforme medido em um ensaio de hemólise por AP; (i) inibe a hemólise de PC mediada por C5 de macaco verde africano com IC_{50} inferior a 185 nM, conforme medido em um ensaio de hemólise por CP; (j) inibe a hemólise de AP mediada por C5 de macaco verde africano com IC_{50} inferior a 235 nM, conforme medido em um ensaio de hemólise de PA; (k) inibe a hemólise por CP mediada por C5 de macaco cynomolgus com IC_{50} menor que 145 nM, conforme medido em um ensaio de hemólise por CP; e (l) inibe a hemólise de PA mediada por C5 de macaco cynomolgus com IC_{50} inferior a 30 nM, conforme medido em um ensaio de hemólise por AP.

[0138] Os anticorpos da presente invenção podem possuir uma ou mais das características biológicas acima mencionadas, ou quaisquer combinações destas. Outras características biológicas dos anticorpos da presente invenção serão evidentes para uma pessoa de experiência

ordinária na técnica a partir de uma revisão da presente descrição incluindo os Exemplos de trabalho aqui apresentados.

Mapeamento de Epítopo e Tecnologias Relacionadas

[0139] A presente invenção inclui anticorpos anti-C5 que interagem com um ou mais aminoácidos encontrados dentro de uma ou mais regiões da molécula de proteína C5 incluindo, o polipeptídeo alfa e o polipeptídeo beta. O epítopo ao qual os anticorpos se ligam pode consistir em uma única sequência contígua de 3 ou mais (por exemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais) aminoácidos localizados em qualquer um dos domínios acima mencionados da molécula da proteína C5 (por exemplo, um epítopo linear em um domínio). Alternativamente, o epítopo pode consistir em uma pluralidade de aminoácidos não contíguos (ou sequências de aminoácidos) localizados dentro de qualquer um ou de ambos os domínios acima mencionados da molécula de proteína (por exemplo, um epítopo conformacional).

[0140] Várias técnicas conhecidas pelas pessoas de experiência ordinária na técnica podem ser usadas para determinar se um anticorpo "interage com um ou mais aminoácidos" dentro de um polipeptídeo ou proteína. Técnicas exemplares incluem, por exemplo, ensaios de bloqueio cruzado de rotina, tais como os descritos em Antibodies, Harlow e Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Outros métodos incluem análise mutacional de varredura de alanina, análise de transferência de peptídeos (Reineke (2004) Methods Mol. Biol. 248: 443-63), estudos de cristalografia de análise de clivagem de peptídeo e análise de NMR. Adicionalmente, podem ser empregues métodos tais como excisão de epítopos, extração de epítopos e modificação química de antígenos (Tomer (2000) Prot. Sei. 9: 487-496). Outro método que pode ser usado para identificar os aminoácidos dentro de um polipeptídeo com o qual um anticorpo interage é a permuta

de hidrogênio/deutério detectada por espectrometria de massa. Em termos gerais, o método de permuta de hidrogênio/deutério envolve a marcação da proteína de interesse pelo deutério, seguida da ligação do anticorpo à proteína marcada com deutério. Em seguida, o complexo proteína/anticorpo é transferido para a água e os prótons permutáveis dentro dos aminoácidos que são protegidos pelo complexo de anticorpos sofrem troca reversa de hidrogênio-para-hidrogênio a uma taxa mais lenta que prótons permutáveis dentro de aminoácidos que não fazem parte da interface. Como resultado, os aminoácidos que fazem parte da interface proteína/anticorpo podem reter deutério e, portanto, exibir uma massa relativamente maior em comparação com os aminoácidos não incluídos na interface. Após a dissociação do anticorpo, a proteína alvo é submetida à análise de clivagem de protease e espectrometria de massa, revelando assim os resíduos marcados com deutério que correspondem aos aminoácidos específicos com os quais o anticorpo interage. Veja, por exemplo, Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267: 252-259; Engen e Smith (2001) Anal. Chem. 73: 256A-265A.

[0141] O termo "epítopo" refere-se a um sítio em um antígeno ao qual as células B e/ou T respondem. Os epítopos de células B podem ser formados tanto a partir de aminoácidos contíguos como de aminoácidos não contíguos, justapostos por dobramento terciário de uma proteína. Os epítopos formados a partir de aminoácidos contíguos são tipicamente retidos por exposição a solventes desnaturantes, enquanto os epítopos formados por dobramento terciário são tipicamente perdidos no tratamento com solventes desnaturantes. Um epítopo inclui tipicamente pelo menos 3, e mais usualmente, pelo menos 5 ou 8-10 aminoácidos em uma conformação espacial única.

[0142] Perfil Assistido por Modificação (MAP), também conhecido como Perfil de Anticorpo com base em Estrutura de Antígeno (ASAP), é

um método que categoriza um grande número de anticorpos monoclonais (mAbs) direcionados contra o mesmo antígeno de acordo com as semelhanças do perfil de ligação de cada anticorpo a superfícies de antígeno quimicamente ou enzimaticamente modificadas (veja, US 2004/0101920, aqui incorporadas especificamente por referência na sua totalidade). Cada categoria pode refletir um único epítopo distintamente diferente ou parcialmente sobreposto ao epítopo representado por outra categoria. Essa tecnologia permite a filtragem rápida de anticorpos geneticamente idênticos, de modo que a caracterização pode ser focada em anticorpos geneticamente distintos. Quando aplicada a avaliação de hibridoma, o MAP pode facilitar a identificação de raros clones de hibridoma que produzem mAbs com as características desejadas. MAP pode ser utilizado para classificar os anticorpos da invenção em grupos de anticorpos que se ligam a diferentes epítopos.

[0143] Em certas modalidades, os anticorpos anti-C5 ou os seus fragmentos de ligação ao antígeno ligam-se a um epítopo dentro de qualquer uma ou mais das regiões exemplificadas na proteína C5, quer na forma natural, como exemplificado na SEQ ID NO: 355, ou produzida por via recombinante, ou a seu fragmento. Em algumas modalidades, os anticorpos da invenção ligam-se a uma região compreendendo um ou mais aminoácidos selecionados do grupo consistindo nos resíduos de aminoácidos 19 - 1676 da proteína C5 humana.

[0144] Em certas modalidades, os anticorpos da invenção, interagem com pelo menos uma sequência de aminoácidos selecionados a partir do grupo que consiste em resíduos de aminoácidos variando de cerca de posição 19 a cerca de posição 750; ou resíduos de aminoácidos que variam desde cerca da posição 751 a cerca da posição 1676 da SEQ ID NO: 355.

[0145] Em certas modalidades, a presente invenção inclui

anticorpos anti-C5 e seus fragmentos de ligação ao antígeno que interagem com um ou mais epítopos encontrados dentro de a cadeia alfa e/ou beta de C5 (SEQ ID NO: 359). O (s) epítopo (s) pode (m) consistir em uma ou mais sequências contíguas de 3 ou mais (por exemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais) aminoácidos localizados na cadeia alfa e/ou beta de C5. Alternativamente, o epítopo pode consistir em uma pluralidade de aminoácidos não contíguos (ou sequências de aminoácidos) localizados dentro de C5. Como mostrado no Exemplo 11, o epítopo de C5 com o qual o anticorpo exemplar da invenção H4H12166P interage é definido por: (i) a sequência de aminoácidos NMATGMDSW (SEQ ID NO: 360) que corresponde aos aminoácidos 591 a 599 compreendidos em a cadeia beta da SEQ ID NO: 359; e (ii) a sequência de aminoácidos $WEV_HLVPRRKQLQFALPDSL$ (SEQ ID NO: 361), que corresponde aos aminoácidos 775 a 794 compreendidos na cadeia alfa da SEQ ID NO: 359. Consequentemente, a presente invenção inclui anticorpos anti-C5 que interagem com um ou mais aminoácidos contidos na região consistindo em (i) a sequência de aminoácidos NMATGMDSW (SEQ ID NO: 360), que corresponde aos aminoácidos 591 a 599 da SEQ ID NO: 359; e (ii) a sequência de aminoácidos WEVHLVPRRKQLQFALPDSL (SEQ ID NO: 361), que corresponde aos aminoácidos 775 a 794 da SEQ ID NO: 359.

[0146] A presente invenção inclui anticorpos anti-C5 que se ligam ao mesmo epítopo, ou uma porção do epítopo, como qualquer um dos anticorpos exemplares específicos listados na Tabela 1. Do mesmo modo, a presente invenção também inclui anticorpos anti-C5 que competem pela ligação proteína C5 ou seu fragmento com qualquer um dos anticorpos exemplares específicos listados na Tabela 1. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos anti-C5 que competem de forma cruzada pela ligação proteína C5 com um ou mais anticorpos

listados na Tabela 1.

[0147] Pode-se facilmente determinar se um anticorpo se liga ao mesmo epítopo como, ou compete por ligação com um anticorpo anti-C5 de referência utilizando métodos de rotina conhecidos na técnica. Por exemplo, para determinar se um anticorpo de teste se liga ao mesmo epítopo que um anticorpo anti-C5 de referência da invenção, deixa-se que o anticorpo de referência se ligue a uma proteína C5 ou a um peptídeo sob condições de saturação. Em seguida, avalia-se a capacidade de um anticorpo de teste se ligar à molécula da proteína C5. Se o anticorpo de teste for capaz de se ligar a C5 após ligação de saturação com o anticorpo anti-C5 de referência, pode concluir-se que o anticorpo de teste se liga a um epítopo diferente do anticorpo anti-C5 de referência. Por outro lado, se o anticorpo de teste não for capaz de se ligar à proteína C5 após a ligação à saturação com o anticorpo anti-C5 de referência, então o anticorpo de teste pode ligar-se ao mesmo epítopo que o epítopo ligado pelo anticorpo anti-C5 de referência da invenção.

[0148] Para determinar se um anticorpo compete pela ligação com um anticorpo anti-C5 de referência, a metodologia de ligação acima descrita é realizada em duas orientações: em uma primeira orientação, o anticorpo de referência é permitido ligar-se a uma proteína C5 sob condições de saturação, seguida pela avaliação da ligação do anticorpo teste à molécula C5. Em uma segunda orientação, o anticorpo de teste é permitido ligar-se a uma molécula C5 sob condições de saturação, seguido de avaliação da ligação do anticorpo de referência à molécula C5. Se, em ambas as orientações, apenas o primeiro anticorpo (saturante) for capaz de se ligar à molécula C5, então conclui-se que o anticorpo de teste e o anticorpo de referência competem pela ligação a C5. Tal como será apreciado por uma pessoa de experiência ordinária na técnica, um anticorpo que concorra à ligação a um anticorpo de

referência pode não se ligar necessariamente ao epítopo idêntico ao anticorpo de referência, mas pode bloquear estericamente a ligação do anticorpo de referência ligando uma sobreposição ou epítopo adjacente.

[0149] Dois anticorpos ligam-se ao mesmo epítopo ou sobrepondo-se se cada um deles inibir competitivamente (bloquear) a ligação do outro ao antígeno. Ou seja, um excesso de um, 1, 5, 10, 20 ou 100 vezes inibe a ligação do outro em pelo menos 50%, mas preferivelmente 75%, 90% ou mesmo 99%, conforme medido em um ensaio de ligação competitivo (veja, por exemplo, Junghans *et al*., Cancer Res. 1990 50: 1495-1502). Alternativamente, dois anticorpos têm o mesmo epítopo se essencialmente todas as mutações de aminoácidos no antígeno que reduzem ou eliminam a ligação de um anticorpo reduzem ou eliminam a ligação do outro. Dois anticorpos têm epítopos sobrepostos se algumas mutações de aminoácidos que reduzem ou eliminam a ligação de um anticorpo reduzem ou eliminam a ligação do outro.

[0150] A experimentação de rotina adicional (por exemplo, mutação de peptídeo e análises de ligação) pode ser realizada para confirmar se a ausência observada de ligação do anticorpo de teste é de fato devida à ligação ao mesmo epítopo do anticorpo de referência ou se bloqueio estérico (ou outro fenômeno) é responsável pela falta de vinculação observada. Experiências deste tipo podem ser realizadas utilizando ELISA, RIA, ressonância de plasmon de superfície, citometria de fluxo ou qualquer outro ensaio quantitativo ou qualitativo de ligação de anticorpo disponível na técnica.

Imunoconjugados

[0151] A invenção engloba um anticorpo monoclonal anti-C5 humano conjugado com uma porção terapêutica ("imunoconjugado"), para tratar uma doença ou distúrbio associado ao C5 (por exemplo, síndrome urêmica hemolítica atípica). Quando aqui utilizado, o termo "imunoconjugado" refere-se a um anticorpo que está quimicamente ou

biologicamente ligado a um agente radioativo, uma citocina, um interferon, um alvo ou porção repórter, uma enzima, um peptídeo ou proteína ou um agente terapêutico. O anticorpo pode estar ligado ao agente radioativo, citocina, interferon, alvo ou porção repórter, enzima, peptídeo ou agente terapêutico em qualquer localização ao longo da molécula, desde que seja capaz de se ligar ao seu alvo. Exemplos de imunoconjugados incluem conjugados de anticorpo e anticorpo e proteínas de fusão anticorpo-toxina. Em uma modalidade, o agente pode ser um segundo anticorpo diferente para a proteína C5. O tipo de porção terapêutica que pode ser conjugado com o anticorpo anti-C5 e terá em conta a condição a ser tratada e o efeito terapêutico desejado a ser alcançado. Exemplos de agentes adequados para formar imunoconjugados são conhecidos na técnica; veja, por exemplo, o documento WO 05/103081.

Anticorpos Multiespecíficos

[0152] Os anticorpos da presente invenção podem ser monoespecíficos, biespecíficos ou multiespecíficos. Anticorpos multiespecíficos podem ser específicos para diferentes epítopos de um polipeptídeo alvo ou podem conter domínios de ligação ao antígeno específicos para mais do que um polipeptídeo alvo. Veja, por exemplo, Tutt *et al*., 1991, J. Immunol. 147: 60-69; Kufer *et al*., 2004, Trends Biotechnol. 22: 238-244.

[0153] Qualquer uma das moléculas de ligação ao antígeno multiespecíficas da invenção, ou suas variantes, pode ser construída utilizando técnicas de biologia molecular padrão (por exemplo, DNA recombinante e tecnologia de expressão proteica), como será do conhecimento de uma pessoa de experiência ordinária na técnica.

[0154] Em algumas modalidades, os anticorpos específicos de C5 são gerados em um formato biespecífico (um "biespecífico") em que as regiões variáveis que se ligam a domínios distintos da proteína C5 são

ligadas para conferir especificidade de domínio duplo dentro de uma única molécula de ligação. Biespecíficos apropriadamente desenhados podem aumentar a eficácia inibidora da proteína C5 em geral, aumentando a especificidade e a avidez de ligação. As regiões variáveis com especificidade para domínios individuais (por exemplo, segmentos do domínio N-terminal) ou que se podem ligar a diferentes regiões em um domínio são emparelhadas em uma estrutura estrutural que permite que cada região se ligue simultaneamente aos epítopos separados ou para diferentes regiões dentro de um domínio. Em um exemplo para um biespecífico, regiões variáveis de cadeia pesada (V_H) de um ligante com especificidade para um domínio são recombinadas com regiões variáveis de cadeia leve (V_L) de uma série de ligantes com especificidade para um segundo domínio para identificar Parceiros V_L não cognatos que podem ser emparelhados com um V_H original sem interromper a especificidade original para esse V_H. Desta forma, um único segmento V_L (por exemplo, V_L1) pode ser combinado com dois domínios V_H diferentes (por exemplo, V_H1 e V_H2) para gerar um biespecífico composto de duas "subdivisões" de ligação (V_H1-V_L1 e V_H2-V_L1). O uso de um único segmento V_L reduz a complexidade do sistema e, portanto, simplifica e aumenta a eficiência nos processos de clonagem, expressão e purificação usados para gerar o biespecífico (veja, por exemplo, USSN13/022759 e US2010/0331527).

[0155] Alternativamente, os anticorpos que se ligam a mais do que um domínio e um segundo alvo, tais como, mas não limitados a, por exemplo, um segundo anticorpo anti-C5 diferente, podem ser preparados em um formato biespecífico utilizando técnicas aqui descritas, ou outras técnicas conhecidas por aqueles versados na técnica. As regiões variáveis de anticorpo que se ligam a regiões distintas podem ser ligadas em conjunto com regiões variáveis que se ligam a sítios relevantes, por exemplo, no domínio extracelular de C5,

para conferir especificidade de antígeno duplo dentro de uma única molécula de ligação. Biespecíficos apropriadamente projetados desta natureza servem uma função dupla. As regiões variáveis com especificidade para o domínio extracelular são combinadas com uma região variável com especificidade para fora do domínio extracelular e são pareadas em uma estrutura estrutural que permite que cada região variável se ligue aos antígenos separados.

[0156] Um formato de anticorpo biespecífico exemplar que pode ser usado no contexto da presente invenção envolve o uso de um primeiro domínio de imunoglobulina (Ig) C_H3 e um segundo domínio Ig3 de C_H3, em que o primeiro e segundo domínios Ig3 de C_H3 diferem uns dos outros por pelo menos um aminoácido, e em que pelo menos uma diferença de aminoácido reduz a ligação do anticorpo biespecífico à Proteína A em comparação com um anticorpo biespecífico sem a diferença de aminoácido. Em uma modalidade, o primeiro domínio C_H3 Ig liga-se à Proteína A e o segundo domínio C_H3 Ig contém uma mutação que reduz ou elimina a ligação da Proteína A tal como uma modificação de H95R (pela numeração de éxons IMGT; H435R por numeração EU). O segundo C_H3 pode ainda compreender uma modificação Y96F (por IMGT; Y436F por EU). Modificações adicionais que podem ser encontradas no segundo C_H3 incluem: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M e V82I (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M e V422I por EU) no caso de anticorpos IgG1; N44S, K52N e V82I (IMGT; N384S, K392N e V422I por EU) no caso de anticorpos IgG2; e Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q e V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q e V422I por EU) no caso de anticorpos IgG4. Variações no formato de anticorpo biespecífico descrito acima são contempladas dentro do escopo da presente invenção.

[0157] Outros formatos biespecíficos exemplares que podem ser

utilizados no contexto da presente invenção incluem, sem limitação, por exemplo, formatos biespecíficos ou baseados em scFv, fusões de IgG-scFv, domínios de variável dupla (DVD) -Ig, Quadroma, *knobs-into-holes*, cadeia leve comum (por exemplo, cadeia leve comum com *knobs-into-holes*, etc.), CrossMab, CrossFab, (SEED) corpo, zíper de leucina, Duobody, IgG1/IgG2, Fab de ação dupla (DAF) - formatos biespecíficos de IgG e Mab^2 (veja, por exemplo, Klein *et al*. 2012, mAbs 4: 6, 1-11 e as referências aqui citadas, para uma revisão dos formatos anteriores). Anticorpos biespecíficos podem também ser construídos utilizando conjugação de peptídeo/ácido nucleico, por exemplo, em que aminoácidos não naturais com reatividade química ortogonal são utilizados para gerar conjugados anticorpo-oligonucleotídeo específico do sítio que depois se automontam em complexos multiméricos com composição, valência e geometria definidas. (Veja, por exemplo, Kazane *et al*., *J. Am. Chem. Soc*. [*Epub: 4 de Dezembro de 2012*]).

Administração Terapêutica e Formulações

[0158] A invenção proporciona composições terapêuticas compreendendo os anticorpos anti-C5 ou seus fragmentos de ligação ao antígeno da presente invenção. As composições terapêuticas de acordo com a invenção serão administradas com veículos, excipientes e outros agentes adequados que são incorporados em formulações para proporcionar transferência, distribuição, tolerância e afins melhorados. Uma multiplicidade de formulações apropriadas pode ser encontrada no formulário conhecido por todos os químicos farmacêuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulações incluem, por exemplo, pós, pastas, unguentos, geleias, ceras, óleos, lípidos, vesículas contendo lipídeos (catiônicos ou aniônicos) (tais como LIPOFECTIN ™), conjugados de DNA, pastas de absorção anidrosas, emulsões óleo em água e água em óleo, emulsões de carbocera (polietilenoglicóis de vários pesos moleculares), géis

semissólidos e misturas semissólidas contendo carbocera. Veja também Powell *et al*. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52: 238-311.

[0159] A dose de anticorpo pode variar dependendo da idade e do tamanho de um indivíduo a ser administrado, doença alvo, condições, via de administração e semelhantes. Quando um anticorpo da presente invenção é utilizado para o tratamento de uma doença ou distúrbio em um paciente adulto, ou para prevenir uma tal doença, é vantajoso administrar o anticorpo da presente invenção normalmente a uma dose única de cerca de 0,1 a cerca de 100 mg/kg de peso corporal, mais preferivelmente cerca de 5 a cerca de 80, cerca de 10 a cerca de 70, ou cerca de 20 a cerca de 50 mg/kg de peso corporal. Dependendo da gravidade da condição, a frequência e a duração do tratamento podem ser ajustadas. Em certas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno da invenção pode ser administrado como uma dose inicial de pelo menos cerca de 0,1 mg a cerca de 800 mg, cerca de 1 a cerca de 600 mg, cerca de 5 a cerca de 500 mg para cerca de 400 mg. Em certas modalidades, a dose inicial pode ser seguida por administração de uma segunda ou uma pluralidade de doses subsequentes do anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno em uma quantidade que pode ser aproximadamente a mesma ou menor que a dose inicial, em que as doses subsequentes são separadas por pelo menos 1 dia a 3 dias; pelo menos uma semana, pelo menos 2 semanas; pelo menos 3 semanas; pelo menos 4 semanas; pelo menos 5 semanas; pelo menos 6 semanas; pelo menos 7 semanas; pelo menos 8 semanas; pelo menos 9 semanas; pelo menos 10 semanas; pelo menos 12 semanas; ou pelo menos 14 semanas.

[0160] São conhecidos vários sistemas de administração e podem ser utilizados para administrar a composição farmacêutica da invenção, por exemplo, encapsulação em lipossomas, micropartículas,

microcápsulas, células recombinantes capazes de expressar os vírus mutantes, endocitose mediada por receptores (veja, por exemplo, Wu *et al*. 1987) J. Biol, Chem 262: 4429-4432). Os métodos de introdução incluem, mas não se limitam às vias intradérmica, transdérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutânea, intranasal, epidural e oral. A composição pode ser administrada por qualquer via conveniente, por exemplo por infusão ou injeção de bolo, por absorção através de revestimentos epiteliais ou mucocutâneos (por exemplo, mucosa oral, mucosa retal e intestinal, etc.) e pode ser administrada em conjunto com outros agentes biologicamente ativos. A administração pode ser sistêmica ou local. A composição farmacêutica pode também ser administrada em uma vesícula, em particular em um lipossoma (veja, por exemplo, Langer (1990) Science 249: 1527-1533).

[0161] A utilização de nanopartículas para distribuir os anticorpos da presente invenção é também aqui contemplada. As nanopartículas conjugadas com anticorpos podem ser usadas para aplicações terapêuticas e de diagnóstico. As nanopartículas conjugadas com o anticorpo e os métodos de preparação e utilização são descritos em detalhe por Arruebo, M., *et al.* 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications " em J. Nanomat. Volume 2009, Artigo ID 439389, 24 páginas, doi: 10.1155/2009/439389), aqui incorporado por referência. As nanopartículas podem ser desenvolvidas e conjugadas com anticorpos contidos em composições farmacêuticas para atingir as células. As nanopartículas para administração de fármacos também foram descritas em, por exemplo, US 8257740, ou US 8246995, cada uma incorporada aqui na sua totalidade.

[0162] Em certas situações, a composição farmacêutica pode ser liberada em um sistema de liberação controlada. Em uma modalidade, uma bomba pode ser usada. Em outra modalidade, materiais poliméricos podem ser usados. Ainda em outra modalidade, um sistema

de libertação controlada pode ser colocado na proximidade do alvo da composição, requerendo assim apenas uma fração da dose sistémica.

[0163] As preparações injetáveis podem incluir formas de dosagem para injeções intravenosas, subcutâneas, intracutâneas, intracranianas, intraperitoneais e intramusculares, infusões por gotejamento, etc. Estas preparações injetáveis podem ser preparadas por métodos conhecidos publicamente. Por exemplo, as preparações injetáveis podem ser preparadas, por exemplo, dissolvendo, suspendendo ou emulsionando o anticorpo ou o seu sal descrito acima em um meio aquoso esterilizado ou em um meio oleoso convencionalmente utilizado para injeções. Como o meio aquoso para injeções, existem, por exemplo, soro fisiológico, uma solução isotônica contendo glicose e outros agentes auxiliares, etc., que podem ser utilizados em combinação com um agente de solubilização apropriado tal como um álcool (por exemplo, etanol), um poliálcool (por exemplo, propilenoglicol, polietileno glicol), um tensoativo não iônico [por exemplo, polissorbato 80, HCO-50 (polioxietileno (50 mol) aduzido de óleo de rícino hidrogenado)], etc. Como meio oleoso, são empregados, por exemplo, óleo de sésamo, óleo de soja, etc., que podem ser utilizados em combinação com um agente solubilizante tal como benzoato de benzila, álcool benzílico, etc. A injeção assim preparada é preferivelmente preenchida em uma ampola apropriada.

[0164] Uma composição farmacêutica da presente invenção pode ser administrada subcutaneamente ou intravenosamente com uma agulha e seringa convencionais. Além disso, no que diz respeito è liberação subcutânea, um dispositivo de liberação de caneta tem facilmente aplicações na liberação de uma composição farmacêutica da presente invenção. Tal dispositivo de liberação de caneta pode ser reutilizável ou descartável. Um dispositivo de liberação de caneta reutilizável geralmente utiliza um cartucho substituível que contém uma

composição farmacêutica. Uma vez que toda a composição farmacêutica dentro do cartucho tenha sido administrada e o cartucho esteja vazio, o cartucho vazio pode ser facilmente descartado e substituído por um novo cartucho que contém a composição farmacêutica. O dispositivo de liberação de caneta pode então ser reutilizado. Em um dispositivo de liberação de caneta descartável, não há cartucho substituível. Pelo contrário, o dispositivo de liberação de caneta descartável vem pré-preenchido com a composição farmacêutica mantida em um reservatório dentro do dispositivo. Uma vez que o reservatório seja esvaziado da composição farmacêutica, todo o dispositivo é descartado.

[0165] Numerosos dispositivos de fornecimento de caneta e autoinjector reutilizáveis têm aplicações na liberação subcutânea de uma composição farmacêutica da presente invenção. Exemplos incluem, mas certamente não estão limitados a AUTOPEN ™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), caneta DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland), caneta HUMALOG MIX 75/25™, caneta HUMALOG™, HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly e Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II e III (Novo Nordisk, Copenhague, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhague, Denmark), caneta BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™,PTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ e OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany), para citar apenas alguns. Exemplos de dispositivos de liberação de caneta descartáveis que têm aplicações na liberação subcutânea de uma composição farmacêutica da presente invenção incluem, mas certamente não estão limitados à caneta SOLOSTAR ™ (Sanofi-Aventis), a FLEXPEN™ (Novo Nordisk) e a KWIKPEN™ (Eli Lilly), o autoinjetor SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), o PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), o EPIPEN (Dey, LP) e a Caneta HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park,

IL), para citar apenas alguns.

[0166] Vantajosamente, as composições farmacêuticas para utilização oral ou parentérica descritas acima são preparadas em formas de dosagem em uma dose unitária adequada para se ajustar a uma dose dos ingredientes ativos. Tais formas de dosagem em uma dose unitária incluem, por exemplo, comprimidos, pílulas, cápsulas, injeções (ampolas), supositórios, etc. A quantidade do anticorpo contido é geralmente de cerca de 5 a cerca de 500 mg por forma de dosagem em uma dose unitária; especialmente na forma de injeção, é preferido que o anticorpo esteja contido em cerca de 5 a cerca de 300 mg e em cerca de 10 a cerca de 300 mg para as outras formas de dosagem.

Utilizações Terapêuticas dos Anticorpos

[0167] Os anticorpos da presente invenção são úteis para o tratamento e/ou prevenção de uma doença ou distúrbio ou condição associada a C5 e/ou para melhorar pelo menos um sintoma associado a essa doença, distúrbio ou condição. Em certas modalidades, um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno da invenção pode ser administrado a uma dose terapêutica a um paciente com uma doença ou distúrbio ou condição associada a C5.

[0168] Em certas modalidades, os anticorpos da presente invenção são úteis no tratamento ou prevenção de um sintoma ou indicação de síndrome urêmica hemolítica atípica (aHUS). Os sintomas e as indicações de aHUS incluem, mas não estão limitados a, ativação plaquetária, hemólise, microangiopatia trombótica sistêmica (formação de coágulos sanguíneos em pequenos vasos sanguíneos em todo o corpo) levando a acidente vascular cerebral, ataque cardíaco, falência renal e/ou morte, doença renal em estágio terminal, dano renal permanente, dor abdominal, confusão, edema, fadiga, náusea/vômito, diarréia e anemia microangiopática.

[0169] Em certas modalidades, os anticorpos da presente invenção

são úteis no tratamento ou prevenção de um sintoma ou indicação de hemoglobinúria paroxística noturna (PNH). Os sintomas e indicações de HPN incluem, mas não estão limitados a destruição de eritrócitos, trombose (incluindo trombose venosa profunda, embolia pulmonar), anemia hemolítica intravascular, descoloração vermelha da urina, sintomas de anemia como cansaço, falta de ar, e palpitações, dor abdominal e dificuldade para engolir.

[0170] Em certas modalidades, os anticorpos da presente invenção são úteis para tratar ou prevenir pelo menos um sintoma ou indicação de uma doença ou distúrbio associado ao C5 selecionado a partir do grupo que consiste em distúrbios neurológicos, distúrbios renais, esclerose múltipla, acidente vascular cerebral, Síndrome de Guillain Barre, traumatismo cranioencefálico, doença de Parkinson, distúrbios da ativação inadequada ou indesejável do complemento, complicações da hemodiálise, rejeição ao aloenxerto hiperagudo, rejeição ao xenoenxerto, toxicidade induzida por interleucina-2 durante terapia com IL-2, distúrbios inflamatórios, inflamação de doenças autoimunes, doença de Crohn, síndrome da angústia respiratória do adulto, lesão térmica incluindo queimaduras ou congelamento, condições de reperfusão após isquêmica, infarto do miocárdio, síndrome de vazamento capilar, obesidade, diabetes, doença de Alzheimer, esquizofrenia, acidente vascular cerebral, epilepsia, aterosclerose, vasculite, penfigoide bolhoso, glomerulopatia C3, glomerulonefrite membranoproliferativa, angioplastia de balão, síndrome após bomba em circulação extracorpórea ou *bypass* renal, hemodiálise, isquemia renal, reperfusão de artéria mesentérica após reconstrução aórtica, doença infecciosa ou sepse, distúrbios do complexo imune e doenças autoimunes, nefropatia diabética, síndrome de Alport, insuficiência renal progressiva, doenças renais proteinúricas, lesão de isquemia-reperfusão renal, nefrite lúpica, glomerulopatia, artrite reumatoide, lúpus

eritematoso sistémico (SLE), nefrite do LES, nefrite membrano-proliferativa, anemia hemolítica, neuromielite óptica, transplante renal, deficiência de CD59 hereditária, psoríase e miastenia grave. Em certas outras modalidades, os anticorpos da presente invenção são úteis para tratar ou prevenir pelo menos um sintoma ou indicação de uma doença ou distúrbio associado a C5 selecionado a partir do grupo consistindo em doença pulmonar e distúrbios tais como dispneia, hemoptise, ARDS, asma, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), enfisema, embolias e enfartes pulmonares, pneumonia, doenças de poeira fibrogênicas, lesões devidas a poeiras e minerais inertes (por exemplo, silício, pó de carvão, berílio e asbesto), fibrose pulmonar, doenças orgânicas da poeira, lesão química (devido a gases irritantese produtos químicos, por exemplo, cloro, fosgênio, dióxido de enxofre, sulfeto de hidrogênio, dióxido de nitrogênio, amônia e ácido clorídrico), lesão por fumaça, lesão térmica (por exemplo, queimadura, congelamento), asma, alergia, broncoconstrição, pneumonite de hipersensibilidade, parasitas, Síndrome de Goodpasture, vasculite pulmonar, angioedema hereditário e inflamação associada ao complexo imune.

[0171] Em certas modalidades, os anticorpos da invenção são úteis para tratar indivíduos que sofrem de uma doença ocular tal como degeneração macular relacionada com a idade (AMD), edema macular diabético (DME), retinopatia diabética, angiogênese ocular (neovascularização ocular que afeta a coroideia, a córnea ou tecido retiniano), atrofia geográfica (GA), uveíte e neuromielite óptica. Os anticorpos da presente invenção podem ser utilizados para tratar ou melhorar pelo menos um sintoma ou indicação de AMD seca ou AMD úmida. Em algumas modalidades, os anticorpos da invenção são úteis na prevenção ou redução da taxa de perda de visão. Em uma modalidade, os anticorpos da presente invenção são úteis na redução de drusas no olho de um indivíduo com AMD seca. Em uma modalidade,

os anticorpos da presente invenção são úteis na prevenção ou redução/redução da perda de visão em um indivíduo com AMD.

[0172] Um ou mais anticorpos da presente invenção podem ser administrados para aliviar ou prevenir ou diminuir a gravidade de um ou mais dos sintomas ou condições/indicações da doença ou distúrbio ocular. Os anticorpos podem ser usados para melhorar ou reduzir a gravidade de pelo menos um sintoma incluindo, mas não limitado a perda de visão, distorção visual, dificuldade de adaptação a baixos níveis de luz, visão central torta, aumento de nebulosidade da visão central/global, presença de drusas (minúsculas acumulações de material extracelular que se acumulam na retina), alterações pigmentares, visão distorcida na forma de metamorfopsia, na qual uma grade de linhas retas parece ondulada e partes da grade podem aparecer em branco, mudanças exsudativas (hemorragias em olho, exsudado duros, subretiniano/sub-RPE/intrarretiniano), recuperação lenta da função visual após exposição à luz forte (teste de fotossíntese), atrofia incipiente e geográfica, acuidade visual drasticamente decrescente (dois níveis ou mais), por exemplo, 20/20 a 20/80, alterações da perimetria da hiperacuidade preferencial (para DMRI úmida), visão turva, perda gradual da visão central (para aqueles com degeneração macular não exsudativa, início rápido da perda da visão dez causadas por vazamento e sangramento de vasos sanguíneos anormais em indivíduos com degeneração macular exsudativa, escotomas centrais (sombras ou áreas de visão ausentes), dificuldade em discernir as cores, especificamente às escuras das escuras e claras das escuras, perda da sensibilidade ao contraste, linhas retas aparecem curvadas em uma grade de Amsler.

[0173] Está também aqui contemplado o uso profilático de um ou mais anticorpos da presente invenção a indivíduos com risco de desenvolver degeneração macular, tais como indivíduos com idade

superior a 50 anos, indivíduos com história familiar de degeneração macular, fumadores e indivíduos com obesidade, colesterol alto, doença cardiovascular ou dieta pouco saudável.

[0174] Em outra modalidade da invenção, os presentes anticorpos são utilizados para a preparação de uma composição farmacêutica ou medicamento para o tratamento de pacientes que sofrem de uma doença ou distúrbio associado a C5. Em outra modalidade da invenção, os presentes anticorpos são utilizados como terapia adjunta com qualquer outro agente ou qualquer outra terapia conhecida pelas pessoas de experiência ordinária na técnica, útil para tratar ou melhorar uma doença ou distúrbio associado a C5.

Terapias de Combinação

[0175] As terapias de combinação podem incluir um anticorpo anti-C5 da invenção e qualquer agente terapêutico adicional que possa ser combinado, de um modo vantajoso, com um anticorpo da invenção ou com um fragmento biologicamente ativo de um anticorpo da invenção. Os anticorpos da presente invenção podem ser combinados sinergicamente com um ou mais fármacos ou terapia utilizada para tratar uma doença ou distúrbio associado a C5. Em algumas modalidades, os anticorpos da invenção podem ser combinados com um segundo agente terapêutico para melhorar um ou mais sintomas da referida doença.

[0176] Dependendo da doença ou distúrbio associado ao C5, os anticorpos da presente invenção podem ser utilizados em combinação com um ou mais agentes terapêuticos adicionais incluindo, mas não limitados a, um anticoagulante (por exemplo, varfarina, aspirina, heparina), fenindiona, fondaparinux, idraparinux e inibidores da trombina, como argatrobana, lepirudina, bivalirudina ou dabigatrana) um fármaco anti-inflamatório (por exemplo, corticosteroides e fármacos antiinflamatórios não esteroidais), um anti-hipertensivo (por exemplo,

um inibidor de enzima conversora da angiotensina), um agente imunossupressor (por exemplo, vincristina, ciclosporina A ou metotrexato), um agente fibrinolítico (por exemplo, ancrode, ácido ε-aminocaproico, antiplasmina-a_1, prostaciclina e defibrotídeo), um agente de redução de lipídeos tal como um inibidor de hidroximetilglutaril CoA redutase, um agente anti-CD20 tal como rituximabe, um agente anti-TNF tal como infliximabe, um agente anticonvulsivo (por exemplo, sulfato de magnésio), um inibidor C3 ou um agente antitrombótico.

[0177] Em certas modalidades, o segundo agente terapêutico é outro anticorpo para proteína C5. É aqui contemplado usar uma combinação ("coquetel") de anticorpos com ampla neutralização ou atividade inibidora contra C5. Em algumas modalidades, os anticorpos não competidores podem ser combinados e administrados a um indivíduo disso necessitado. Em algumas modalidades, os anticorpos compreendendo a combinação ligam-se a epítopos não sobrepostos distintos na proteína. Os anticorpos que compreendem a combinação podem bloquear a ligação de C5 a C5 convertase e/ou podem prevenir/inibir a clivagem de C5 em C5a e C5b. Em certas modalidades, o segundo anticorpo pode possuir uma meia-vida mais longa no soro humano.

[0178] Quando aqui utilizado, o termo "em combinação com" significa que o (s) componente (s) terapeuticamente ativo (s) adicional (is) pode (m) ser administrado (s) antes, concomitante (s) ou após a administração do anticorpo anti-C5 da presente invenção. O termo "em combinação com" também inclui a administração sequencial ou concomitante de um anticorpo anti-C5 e um segundo agente terapêutico.

[0179] O(s) componente(s) adicional(is) terapeuticamente ativo(s) pode(m) ser administrado(s) a um indivíduo antes da administração de

um anticorpo anti-C5 da presente invenção. Por exemplo, pode-se considerar que um primeiro componente é administrado "antes" de um segundo componente se o primeiro componente for administrado uma semana antes, 72 horas antes, 60 horas antes, 48 horas antes, 36 horas antes, 24 horas antes, 12 horas antes, 6 horas antes, 5 horas antes, 4 horas antes, 3 horas antes, 2 horas antes, 1 hora antes, 30 minutos antes, 15 minutos antes, 10 minutos antes, 5 minutos antes ou menos de 1 minuto antes da administração do segundo componente. Em outras modalidades, o (s) componente (s) terapeuticamente ativo (s) adicional (ais) pode (m) ser administrado (s) a um indivíduo após administração de um anticorpo anti-C5 da presente invenção. Por exemplo, pode considerar-se que um primeiro componente é administrado "após" um segundo componente se o primeiro componente for administrado 1 minuto depois, 5 minutos depois, 10 minutos depois, 15 minutos depois, 30 minutos depois, 1 hora depois, 2 horas após, 3 horas após, 4 horas após, 5 horas após, 6 horas após, 12 horas após, 24 horas após, 36 horas após, 48 horas após, 60 horas após, 72 horas após a administração do segundo componente. Ainda em outras modalidades, o (s) componente (s) terapeuticamente ativo (s) adicional (ais) pode (m) ser administrado (s) a um indivíduo concorrente com a administração de um anticorpo anti-C5 da presente invenção. A administração "concorrente", para os fins da presente invenção, inclui, por exemplo, administração de um anticorpo anti-C5 e um componente terapeuticamente ativo adicional a um indivíduo em uma forma de dosagem ica, ou em formas de dosagem separadas administradas ao indivíduo dentro de cerca de 30 minutos ou menos um do outro. Se administrada em formas de dosagem separadas, cada forma de dosagem pode ser administrada pela mesma via (por exemplo, tanto o anticorpo anti-C5 como o componente terapeuticamente ativo adicional podem ser administrados intravenosamente, etc.); alternativamente,

cada forma de dosagem pode ser administrada através de uma via diferente (por exemplo, o anticorpo anti-C5 pode ser administrado intravenosamente e o componente terapeuticamente ativo adicional pode ser administrado oralmente). Em qualquer caso, a administração dos componentes em uma dosagem única a partir de formas de dosagem separadas pela mesma via, ou em formas de dosagem separadas por diferentes vias, é considerada "administração concorrente", para os fins da presente descrição. Para fins da presente descrição, a administração de um anticorpo anti-C5 "antes de", "concorrente com" ou "depois" (como os termos aqui definidos acima) a administração de um componente terapeuticamente ativo adicional é considerada administração de um anti-C5 anticorpo "em combinação com" um componente terapeuticamente ativo adicional.

[0180] A presente invenção inclui composições farmacêuticas nas quais um anticorpo anti-C5 da presente invenção é coformulado com um ou mais dos componentes adicionais terapeuticamente ativos, como aqui descrito em outro lugar.

Regimes de Administração

[0181] De acordo com certas modalidades, pode ser administrada uma dose única de um anticorpo anti-C5 da invenção (ou uma composição farmacêutica compreendendo uma combinação de um anticorpo anti-C5 e qualquer um dos agentes terapeuticamente ativos adicionais aqui mencionados) a um indivíduo disso necessitado. De acordo com certas modalidades da presente invenção, doses múltiplas de um anticorpo anti-C5 (ou uma composição farmacêutica compreendendo uma combinação de um anticorpo anti-C5 e qualquer dos agentes terapeuticamente ativos adicionais aqui mencionados) podem ser administradas a um indivíduo ao longo de um curso de tempo definido. Os métodos de acordo com este aspecto da invenção compreendem administrar sequencialmente a um indivíduo doses

múltiplas de um anticorpo anti-C5 da invenção. Quando aqui utilizado, "administrar sequencialmente" significa que cada dose de anticorpo anti-C5 é administrada ao indivíduo em um ponto diferente no tempo, por exemplo, em dias diferentes separados por um intervalo predeterminado (por exemplo, horas, dias, semanas ou meses). A presente invenção inclui métodos que compreendem administrar sequencialmente ao paciente uma dose inicial única de um anticorpo anti-C5, seguido por uma ou mais doses secundárias do anticorpo anti-C5 e, opcionalmente, seguido por uma ou mais doses terciárias do anticorpo anti-C5.

[0182] Os termos "dose inicial", "doses secundárias" e "doses terciárias" referem-se à sequência temporal de administração do anticorpo anti-C5 da invenção. Assim, a "dose inicial" é a dose que é administrada no início do regime de tratamento (também referida como a "dose de base"); as "doses secundárias" são as doses administradas após a dose inicial; e as "doses terciárias" são as doses administradas após as doses secundárias. As doses inicial, secundária e terciária podem todas conter a mesma quantidade de anticorpo anti-C5, mas geralmente podem diferir uma da outra em termos de frequência de administração. Em certas modalidades, no entanto, a quantidade de anticorpo anti-C5 contido nas doses inicial, secundária e/ou terciária varia um do outro (por exemplo, ajustado para cima ou para baixo conforme apropriado) durante o decurso do tratamento. Em certas modalidades, duas ou mais (por exemplo, 2, 3, 4 ou 5) doses são administradas no início do regime de tratamento como "doses de carga" seguidas por doses subsequentes que são administradas em uma base menos frequente (por exemplo, " doses de manutenção ").

[0183] Em certas modalidades exemplares da presente invenção, cada dose secundária e/ou terciária é administrada de 1 a 48 horas (por exemplo, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6 ½, 7, 7 ½, 8, 8 ½, 9, 9

½, 10, 10 ½, 11, 11 ½, 12, 12 ½, 13, 13 ½, 14, 14 ½, 15, 15 ½, 16, 16 ½, 17, 17 ½, 18, 18 ½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, ou mais) após a dose imediatamente anterior. A frase "a dose imediatamente anterior", quando aqui utilizada, significa, em uma sequência de administrações múltiplas, a dose de anticorpo anti-C5 que administrada a um paciente antes da administração da dose seguinte na sequência sem doses de intervenção.

[0184] Os métodos de acordo com este aspecto da invenção podem compreender administrar a um paciente qualquer número de doses secundárias e/ou terciárias de um anticorpo anti-C5. Por exemplo, em certas modalidades, apenas uma única dose secundária é administrada ao paciente. Em outras modalidades, duas ou mais doses secundárias (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou mais) são administradas ao paciente. Do mesmo modo, em certas modalidades, apenas uma única dose terciária é administrada ao paciente. Em outras modalidades, duas ou mais doses (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou mais) terciárias são administradas ao paciente.

[0185] Em certas modalidades da invenção, a frequência com que as doses secundárias e/ou terciárias são administradas a um paciente pode variar ao longo do curso do regime de tratamento. A frequência de administração também pode ser ajustada durante o curso do tratamento por um médico, dependendo das necessidades do paciente individual após o exame clínico.

Utilizações Diagnósticas dos Anticorpos

[0186] Os anticorpos anti-C5 da presente invenção podem ser utilizados para detectar e/ou medir C5 em uma amostra, por exemplo, para fins de diagnóstico. Algumas modalidades contemplam a utilização de um ou mais anticorpos da presente invenção em ensaios para detectar uma doença ou distúrbio associado a C5. Ensaios de

diagnóstico exemplares para C5 podem compreender, por exemplo, o contato de uma amostra, obtida de um paciente, com um anticorpo anti-C5 da invenção, em que o anticorpo anti-C5 marcado com um marcador detectável ou molécula repórter ou utilizado como ligante de captura para isolar seletivamente C5 de amostras de pacientes. Alternativamente, um anticorpo anti-C5 não marcado pode ser utilizado em aplicações de diagnóstico em combinação com um anticorpo secundário que é ele próprio marcado de forma detectável. A molécula marcadora ou repórter detectável pode ser um radioisótopo, tal como ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S ou ^{125}I; uma unidade fluorescente ou quimioluminescente tal como isotiocianato de fluoresceína ou rodamina; ou uma enzima tal como fosfatase alcalina, β-galactosidase, peroxidase de rábano-picante ou luciferase. Ensaios exemplares específicos que podem ser utilizados para detectar ou medir C5 em uma amostra incluem ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), radioimunoensaio (RIA) e separação celular ativada por fluorescência (FACS).

[0187] As amostras que podem ser utilizadas em ensaios de diagnóstico C5 de acordo com a presente invenção incluem qualquer amostra de tecido ou fluido obtenível a partir de um paciente, que contenha quantidades detectáveis de proteína C5, ou seus fragmentos, sob congelamento normal ou condições patológicas. Geralmente, os níveis de proteína C5 em uma amostra particular obtida de um paciente saudável (por exemplo, um paciente não afligido com uma doença associada a C5) serão medidos para estabelecer inicialmente um nível de linha de base ou padrão de C5. Este nível de linha de base de C5 pode então ser comparado com os níveis de C5 medidos em amostras obtidas de indivíduos suspeitos de terem uma condição associada a C5, ou sintomas associados a essa condição.

[0188] Os anticorpos específicos para a proteína C5 podem não

conter marcadores ou porções adicionais, ou podem conter um marcador ou porção N-terminal ou C-terminal. Em uma modalidade, o marcador ou porção é biotina. Em um ensaio de ligação, a localização de um marcador (se houver) pode determinar a orientação do peptídeo relativamente superfície sobre a qual o peptídeo está ligado. Por exemplo, se uma superfície é revestida com avidina, um peptídeo contendo uma biotina N-terminal será orientado de tal modo que a porção C-terminal do peptídeo seja distal à superfície.

Modalidades Selecionadas

[0189] Modalidades selecionadas da presente descrição incluem o seguinte:

[0190] Na Modalidade 1, a presente invenção inclui um anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente à proteína do fator 5 (C5) do complemento, em que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno interage com um ou mais aminoácidos contidos dentro de C5 (SEQ ID NO: 359), como determinado por permuta de hidrogênio/deutério.

[0191] Na Modalidade 2, a presente invenção inclui o anticorpo isolado do fragmento de ligação ao antígeno da modalidade 1, em que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno interage com um ou mais aminoácidos contidos na cadeia alfa e/ou na cadeia beta de C5, conforme determinado pela permuta de hidrogênio/deutério.

[0192] Na Modalidade 3, a presente invenção inclui o anticorpo isolado do fragmento de ligação ao antígeno das modalidades 1 ou 2, em que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno não interage com um aminoácido da região de anafilatoxina C5a de C5, como determinado pela permuta de hidrogênio/deutério.

[0193] Na Modalidade 4, a presente invenção inclui o anticorpo isolado do fragmento de ligação ao antígeno de qualquer uma das modalidades 1 a 3, em que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao

antígeno interage com um ou mais aminoácidos contidos na SEQ ID NO: 360 e/ou SEQ ID NO: 361, como determinado por permuta de hidrogênio/deutério.

[0194] Na Modalidade 5, a presente invenção inclui o anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno de qualquer uma das modalidades 1 a 4, em que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno interage com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em (a) aminoácidos 591 a 599 da SEQ ID NO: 359; (b) aminoácidos 593 a 599 da SEQ ID NO: 359; (c) aminoácidos 775 a 787 da SEQ ID NO: 359; (d) aminoácidos 775 a 794 da SEQ ID NO: 359; e (e) aminoácidos 779 a 787 da SEQ ID NO: 359.

[0195] Na Modalidade 6, a presente invenção inclui o anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno de qualquer uma das modalidades 1 a 5, em que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno interage com pelo menos cinco aminoácidos contidos em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 360 e 361.

[0196] Na Modalidade 7, a presente invenção inclui o anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno de qualquer uma das Modalidades 1 a 5, em que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno interage com as sequências de aminoácidos das SEQ ID Nos: 360 e 361.

[0197] Na Modalidade 8, a presente invenção inclui um anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente à proteína do fator 5 (C5) do complemento, em que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno interage com pelo menos um dos seguintes resíduos de aminoácidos: N591, M592, A593, T594, G595, M596, D597, S598, W599, W775, E776, V777, H778, L779, V780, P781, R782, R783, K784, Q785, L786, Q787, F788, A789, L790, P791, D792, S793 ou L794 da SEQ ID. NO: 359.

[0198] Na Modalidade 9, a presente invenção inclui o anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno de qualquer uma das Modalidades 1 a 8, em que o anticorpo possui uma ou mais das seguintes características: (a) tem concentração sérica de mais de 10 µg/mL até ao dia 70 após administração ao macaco cynomolgus; (b) bloqueia a hemólise por via clássica (PC) até ao dia 35 após administração ao macaco cynomolgus, conforme medido em um ensaio de hemólise *ex vivo*; (c) bloqueia a hemólise por via alternativa (AP) até ao dia 35 após administração ao macaco cynomolgus, conforme medido em um ensaio de hemólise *ex vivo*; (d) tem uma meia-vida no soro de mais de 10 dias em macaco cynomolgus; (e) tem concentração sérica de mais de 10 µg/mL até ao dia 40 após administração a camundongos humanizados C5; (f) bloqueia a hemólise por CP até ao dia 30 após administração a camundongos humanizados em C5, conforme medido em um ensaio de hemólise *ex vivo*; e (g) tem meia-vida sérica de mais de 10 dias em camundongos humanizados C5.

[0199] Na modalidade 10, a presente invenção inclui o anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno de qualquer uma das modalidades 1 a 9, em que o anticorpo tem uma característica adicional selecionada a partir do grupo que consiste em: (a) é um totalmente humano anticorpo monoclonal; (b) liga-se ao C5 humano com uma constante de dissociação (K_D) inferior a 0,9 nM a 25°C, conforme medido em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície; (c) liga-se ao C5 humano com uma K_D inferior a 0,3 nM a 37°C, conforme medido em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície; (d) liga-se ao C5 de macaco com uma K_D inferior a 65 nM, conforme medido em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície; (e) liga-se à variante C5 humana R885H (SEQ ID NO: 356) com uma K_D inferior a 0,5 nM, conforme medido em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície; (f) liga-se à variante C5 humana R885C (SEQ ID NO: 357)

com uma K_D inferior a 0,5 nM, conforme medido em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície; (g) bloqueia a hemólise por via clássica (PC) mediada por C5 humana em mais de 95% e com IC_{50} inferior a 6 nM, conforme medido em um ensaio de hemólise por CP; (h) bloqueia a hemólise por via alternativa mediada por C5 humana (AP) em mais de 70% e com IC_{50} inferior a 165 nM, conforme medido em um ensaio de hemólise por AP; (i) inibe a hemólise de PC mediada por C5 de macaco verde africano com IC_{50} inferior a 185 nM, conforme medido em um ensaio de hemólise por CP; (j) inibe a hemólise de após mediada por C5 de macaco verde africano com IC_{50} inferior a 235 nM, conforme medido em um ensaio de hemólise de PA; (k) inibe a hemólise por CP mediada por C5 de macaco cynomolgus com IC_{50} inferior a 145 nM, conforme medido em um ensaio de hemólise por CP; e (l) inibe a hemólise de PA mediada por C5 de macaco cynomolgus com IC_{50} inferior a 30 nM, conforme medido em um ensaio de hemólise por AP.

[0200] Na Modalidade 11, a presente invenção inclui o anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno de qualquer uma das modalidades 1 a 10, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreende três regiões determinantes de complementaridade de cadeias pesadas (CDRs) (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) contida em qualquer uma das sequências da região variável da cadeia pesada (HCVR) listadas na Tabela 1; e três CDRs de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) contida em qualquer uma das sequências da região variável de cadeia leve (LCVR) listadas na Tabela 1.

[0201] Na Forma de Modalidade 12, a presente invenção inclui o anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno de qualquer uma das Modalidades 1 a 11, compreendendo: (a) um domínio HCDR1 possuindo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 124, 140 148,

156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 276, 292, 308, 324 e 340; (b) um domínio HCDR2 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 126, 142, 150, 158, 174, 190, 206, 222. 238, 254, 270, 278, 294, 310, 326 e 342; (c) um domínio HCDR3 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 128, 144, 152, 160, 176, 192, 208, 224. 240, 256, 272, 280, 296, 312, 328 e 344; (d) um domínio LCDR1 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 116, 132, 164, 180, 196, 212, 228, 244. 260, 284, 300, 316, 332 e 348; (e) um domínio LCDR2 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 118, 134, 166, 182, 198, 214, 230, 246. 262, 286, 302, 318, 334 e 350; e (f) um domínio LCDR3 tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 120, 136, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 288, 304, 320, 336 e 352.

[0202] Na Modalidade 13, a presente invenção inclui o anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno de qualquer uma das Modalidades 1 a 12 compreendendo uma HCVR tendo um aminoácido sequência selecionada a partir do grupo consistindo em sequências de HCVR listadas na Tabela 1.

[0203] Na Modalidade 14, a presente invenção inclui um anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno da Modalidade 13 compreendendo uma LCVR possuindo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em sequências de LCVR listadas na Tabela 1.

[0204] Na Modalidade 15, a presente invenção inclui o anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno de qualquer das

Modalidades 11 a 14 compreendendo um par de sequências de aminoácidos HCVR/LCVR selecionado a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/9 0, 98/106, 98/114, 122/106, 98/130, 138/106, 146/106, 122/130, 146/114, 146/130, 138/130, 154/162, 170/178, 186/194, 202/210, 218/226, 234/242, 250/258, 266/258, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330 e 338/346.

[0205] Na modalidade 16, a presente invenção inclui o anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno de qualquer uma das modalidades 11 a 15 compreendendo três CDRs contidas em uma HCVR selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 50, 98, 138 e 202; e três CDRs contidas dentro de uma LCVR selecionado a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 58, 106 e 210.

[0206] Na Modalidade 17, a presente invenção inclui o anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno da Modalidade 16, compreendendo CDRs selecionados do grupo que consiste em: (a) SEQ ID NOs: 52, 54, 56, 60, 62 e 64; (b) SEQ ID NOs: 100, 102, 104, 108, 110 e 112; (c) SEQ ID NOs: 140, 142, 144, 108, 110 e 112; e (d) SEQ ID NOs: 204, 206, 208, 212, 214 e 216.

[0207] Na Modalidade 18, a presente invenção inclui o anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno da Modalidade 17 compreendendo um par de sequências de aminoácido HCVR/LCVR selecionado a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 50/58, 98/106, 138/106 e 202/210.

[0208] Na modalidade 19, a presente invenção inclui um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno que compete pela ligação a C5 com o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno da modalidade 17.

[0209] Na modalidade 20, a presente invenção inclui um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga ao mesmo epítopo que um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno da

modalidade 17.

[0210] Na modalidade 21, a presente invenção inclui o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno da modalidade 9 ou 10 compreendendo uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos listada na Tabela 1 tendo não mais do que 5 substituições de aminoácidos.

[0211] Na modalidade 22, a presente invenção inclui o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno da modalidade 21, compreendendo uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos listada na Tabela 1 tendo não mais do que 5 substituições de aminoácidos.

[0212] Na Modalidade 23, a presente invenção inclui o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno da modalidade 9 ou 10 compreendendo uma região variável de cadeia pesada tendo pelo menos 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 98.

[0213] Na Modalidade 24, a presente invenção inclui um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno da modalidade 23 compreendendo uma região variável da cadeia leve com pelo menos 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 106.

[0214] Na modalidade 25, a presente invenção inclui um anticorpo monoclonal isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno que bloqueia a clivagem de C5 a C5a e C5b compreendendo três CDR de uma HCVR, em que a HCVR possui uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 122, 138, 146, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 274, 290, 306, 322 e 338; e três CDR de uma LCVR, em que a LCVR possui uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 114, 130, 162, 178, 194, 210., 226, 242, 258, 282, 298, 314, 330 e 346.

[0215] Na Modalidade 26, a presente invenção inclui uma

composição farmacêutica compreendendo um anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga a C5 de acordo com qualquer uma das Modalidades 1 a 25 e um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

[0216] Na modalidade 27, a presente invenção inclui uma molécula de polinucleotídeo isolada compreendendo uma sequência de polinucleotídeo que codifica para uma HCVR de um anticorpo, tal como estabelecido em qualquer uma das modalidades 1 a 25.

[0217] Na modalidade 28, a presente invenção inclui uma molécula de polinucleotídeo isolada compreendendo uma sequência de polinucleotídeo que codifica uma LCVR de um anticorpo como estabelecido em qualquer uma das Modalidades 1 a 25.

[0218] Na Modalidade 29, a presente invenção inclui um vetor compreendendo a sequência de polinucleotídeo da Modalidade 27 ou 28.

[0219] Na Modalidade 30, a presente invenção inclui uma célula que expressa o vetor da Modalidade 29.

[0220] Na Modalidade 31, a presente invenção inclui um método de prevenção, tratamento ou melhoria de pelo menos um sintoma ou indicação de uma doença ou distúrbio associado com C5, o método compreendendo a administração de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno de qualquer uma das modalidades 1 a 25 a um indivíduo disso necessitado.

[0221] Na modalidade 32, a presente invenção inclui o método da modalidade 31, em que a doença ou distúrbio é selecionado a partir do grupo que consiste em síndrome urêmica hemolítica atípica (aHUS), hemoglobinúria paroxística noturna (PNH), degeneração macular relacionada à idade, atrofia geográfica, uveíte, neuromielite óptica, esclerose múltipla, acidente vascular cerebral, síndrome de Guillain Barré, traumatismo cranioencefálico, doença de Parkinson, distúrbios

da ativação inadequada ou indesejável do complemento, complicações da hemodiálise, rejeição alogênica hiperaguda, rejeição ao xenoenxerto, toxicidade induzida pela interleucina-2 durante IL-IL. 2 terapia, distúrbios inflamatórios, inflamação de doenças autoimunes, doença de Crohn, síndrome da angústia respiratória do adulto, lesão térmica incluindo queimaduras ou queimaduras, condições de reperfusão após isquêmica, infarto do miocárdio, síndrome de vazamento capilar, obesidade, diabetes, doença de Alzheimer, esquizofrenia, acidente vascular cerebral, epilepsia, aterosclerose, vasculite, penfigoide bolhoso, gl C3 omerulopatia, glomerulonefrite membramproliferativa, nefropatia diabética, síndrome de Alport, insuficiência renal progressiva, doenças renais proteinúricas, lesão de isquemia-reperfusão renal, nefrite lúpica, angioplastia com balão, síndrome após bomba em circulação extracorpórea ou *bypass* renal, hemodiálise, isquemia renal, reperfusão de artéria mesentérica após reconstrução aórtica, doença infecciosa ou sepse, distúrbios do complexo imune e doenças autoimunes, distúrbios renais, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico (LES), nefrite da LES, nefrite proliferativa, anemia hemolítica, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), enfisema, embolia pulmonar e infartos pulmonares, pneumonia e miastenia grave.

[0222] Na modalidade 33, a presente invenção inclui o método da modalidade 31, em que a doença ou distúrbio é aHUS.

[0223] Na modalidade 34, a presente invenção inclui o método da modalidade 31, em que a doença ou distúrbio é PNH.

[0224] Na modalidade 35, a presente invenção inclui o método de qualquer uma das modalidades 31 a 34, em que a composição farmacêutica é administrada profilaticamente ou terapeuticamente ao indivíduo disso necessitado.

[0225] Na modalidade 36, a presente invenção inclui o método de

qualquer uma das modalidades 31 a 35, em que a composição farmacêutica é administrada em combinação com um segundo agente terapêutico.

[0226] Na modalidade 37, a presente invenção inclui o método da modalidade 36, em que o segundo agente terapêutico é selecionado a partir do grupo que consiste em um anticoagulante, um fármaco anti-inflamatório, um anti-hipertensivo, um agente imunossupressor, um agente redutor de lipídio, um agente anti-CD20 tal como rituximabe, um agente anti-TNF tal como infliximabe, um agente anticonvulsivo, um inibidor de C3, um segundo anticorpo anti-C5 e um agente antitrombótico.

[0227] Na modalidade 38, a presente invenção inclui o método de qualquer uma das modalidades 31 a 37, em que a composição farmacêutica é administrada subcutaneamente, intravenosamente, intradermicamente, intraperitonealmente, oralmente, intramuscularmente ou intracranianamente.

EXEMPLOS

[0228] Os exemplos seguintes são apresentados de modo a fornecer aos especialistas na técnica uma divulgação e descrição completas de como fazer e usar os métodos e composições da invenção, e não pretendem limitar o escopo do qual os inventores consideram como sua invenção. Esforços têm sido feitos para garantir a precisão em relação aos números usados (por exemplo, quantidades, temperatura, etc.), porém, alguns erros experimentais e desvios devem ser considerados. A menos que de outra maneira indicado, as partes são partes em peso, o peso molecular é o peso molecular médio, a temperatura é em graus Celsius, a temperatura ambiente é cerca de 25ºC e a pressão é próxima da atmosférica.

Exemplo 1: Geração de Anticorpos Humanos para a proteína de Fator de Complemento (C5)

[0229] Os anticorpos humanos para a proteína C5 foram gerados em um camundongo de VELOCIMMUNE® compreendendo DNA codificando regiões variáveis de cadeia pesada e leve de capa de Imunoglobulina humana. Os camundongos foram imunizados com proteína C5 humana purificada em soro (Calbiochem Cat # 20-4888).

[0230] A resposta imune do anticorpo foi monitorada por um imunoensaio específico de C5. Quando uma resposta imune desejada foi atingida, os esplenócitos foram colhidos e fundidos com células de mieloma de camundongo para preservar a sua viabilidade e formar linhagens celulares de hibridoma. As linhagens celulares de hibridoma foram avaliadas e selecionadas para identificar linhagens celulares que produzem anticorpos específicos de C5. As linhagens celulares foram usadas para obter vários anticorpos quiméricos anti-C5 (isto é, anticorpos possuindo domínios variáveis humanos e domínios constantes de camundongo); anticorpos exemplares gerados desta maneira foram designados como H2M11683N e H2M11686N.

[0231] Os anticorpos anti-C5 foram também isolados diretamente a partir de células B de camundongo positivas para antígenos sem fusão com células de mieloma, como descrito na Patente U.S. 7582298, aqui incorporada especialmente por referência em sua totalidade. Usando este método, vários anticorpos anti-C5 totalmente humanos (isto é, anticorpos possuindo domínios variáveis humanos e domínios constantes humanos) foram obtidos; anticorpos exemplares gerados desta maneira foram designados como H4H12159P, H4H12161P, H4H12163P, H4H12164P, H4H12166P, H4H12167P, H4H12168P, H4H12169P, H4H12170P, H4H12171P, H4H12175P, H4H12176P2, H4H12177P2 e H4H12183P2.

[0232] As propriedades biológicas dos anticorpos exemplares gerados de acordo com os métodos deste Exemplo são descritas em detalhes nos Exemplos apresentados abaixo.

Exemplo 2: Sequências de Aminoácido e Nucleotídeo de Região Variável de Cadeia Pesada e Leve

[0233] A Tabela 1 apresenta os identificadores de sequência de aminoácido das regiões variáveis de cadeia pesada e leve e CDRs de anticorpos anti-C5 selecionados da invenção.

Tabela 1: Identificadores de Sequência de Aminoácido

	SEQ ID NOs:							
Designação de Anticorpo	**HCVR**	**HCDR1**	**HCDR2**	**HCDR3**	**LCVR**	**LCDR1**	**LCDR2**	**LCDR3**
H2M11683N	2	4	6	8	10	12	14	16
H2M11686N	18	20	22	24	26	28	30	32
H4H12159P	34	36	38	40	42	44	46	48
H4H12161P	50	52	54	56	58	60	62	64
H4H12163P	66	68	70	72	74	76	78	80
H4H12164P	82	84	86	88	90	92	94	96
H4H12166P	98	100	102	104	106	108	110	112
H4H12166P2	98	100	102	104	114	116	118	120
H4H12166P3	122	124	126	128	106	108	110	112
H4H12166P4	98	100	102	104	130	132	134	136
H4H12166P5	138	140	142	144	106	108	110	112
H4H12166P6	146	148	150	152	106	108	110	112
H4H12166P7	122	124	126	128	130	132	134	136
H4H12166P8	146	148	150	152	114	116	118	120
H4H12166P9	146	148	150	152	130	132	134	136
H4H12166P10	138	140	142	144	130	132	134	136
H4H12167P	154	156	158	160	162	164	166	168
H4H12168P	170	172	174	176	178	180	182	184
H4H12169P	186	188	190	192	194	196	198	200
H4H12170P	202	204	206	208	210	212	214	216
H4H12171P	218	220	222	224	226	228	230	232
H4H12175P	234	236	238	240	242	244	246	248
H4H12176P2	250	252	254	256	258	260	262	264
H4H12177P2	266	268	270	272	258	260	262	264
H4H12183P2	274	276	278	280	282	284	286	288
H2M11682N	290	292	294	296	298	300	302	304
H2M11684N	306	308	310	312	314	316	318	320
H2M11694N	322	324	326	328	330	332	334	336
H2M11695N	338	340	342	344	346	348	350	352

[0234] Os identificadores de sequência de ácido nucleico correspondentes são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Identificadores de Sequência de Ácido Nucleico

	SEQ ID NOs:							
Designação de Anticorpo	**HCVR**	**HCDR 1**	**HCDR2**	**HCDR3**	**LCVR**	**LCDR1**	**LCDR2**	**LCDR3**
H2M11683N	1	3	5	7	9	11	13	15
H2M11686N	17	19	21	23	25	27	29	31
H4H12159P	33	35	37	39	41	43	45	47
H4H12161P	49	51	53	55	57	59	61	63
H4H12163P	65	67	69	71	73	75	77	79
H4H12164P	81	83	85	87	89	91	93	95
H4H12166P	97	99	101	103	105	107	109	111
H4H12166P2	97	99	101	103	113	115	117	119
H4H12166P3	121	123	125	127	105	107	109	111
H4H12166P4	97	99	101	103	129	131	133	135
H4H12166P5	137	139	141	143	105	107	109	111
H4H12166P6	145	147	149	151	105	107	109	111
H4H12166P7	121	123	125	127	129	131	133	135
H4H12166P8	145	147	149	151	113	115	117	119
H4H12166P9	145	147	149	151	129	131	133	135
H4H12166P10	137	139	141	143	129	131	133	135
H4H12167P	153	155	157	159	161	163	165	167
H4H12168P	169	171	173	175	177	179	181	183
H4H12169P	185	187	189	191	193	195	197	199
H4H12170P	201	203	205	207	209	211	213	215
H4H12171P	217	219	221	223	225	227	229	231
H4H12175P	233	235	237	239	241	243	245	247
H4H12176P2	249	251	253	255	257	259	261	263
H4H12177P2	265	267	269	271	257	259	261	263
H4H12183P2	273	275	277	279	281	283	285	287
H2M11682N	289	291	293	295	297	299	301	303
H2M11684N	305	307	309	311	313	315	317	319
H2M11694N	321	323	325	327	329	331	333	335
H2M11695N	337	339	341	343	345	347	349	351

[0235] Os anticorpos são tipicamente referidos aqui de acordo com a seguinte nomenclatura: prefixo Fc (por exemplo, "H4H", "H2M", etc.), seguido por um identificador numérico (por exemplo, "11686", "12166", "12183" etc., como mostrado na Tabela 2), seguido por um sufixo "P", "P2" ou "N". Assim, de acordo com esta nomenclatura, um anticorpo pode ser aqui referido como, por exemplo, "H2M11686N," "H4H12183P2," "H4H12168P", etc. Os prefixos H4H e H2M sobre as designações de anticorpo aqui usadas indicam o isótipo da região Fc particular do anticorpo. Por exemplo, um anticorpo "H4H" tem uma Fc de IgG4 humana compreendendo uma mutação de serina para prolina

na região de articulação (S108P) para promover a estabilização do dímero, e um anticorpo "H2M" tem uma Fc de IgG2Fc de camundongo (isótipo a ou b) (todas as regiões variáveis são totalmente humanas como denotado pelo primeiro 'H' na designação de anticorpo). Como será apreciado por uma pessoa de experiência ordinária na técnica, um anticorpo tendo um isótipo de Fc particular pode ser convertido em um anticorpo com um isótipo de Fc diferente (por exemplo, um anticorpo com uma Fc de IgG1 de camundongo pode ser convertido em um anticorpo com um IgG4 humano, etc.) porém, em qualquer caso, os domínios variáveis (incluindo as CDRs) - que são indicados pelos identificadores numéricos mostrados na Tabela 2 - permanecerão os mesmos, e espera-se que as propriedades de ligação ao antígeno sejam idênticas ou substancialmente similares, independentemente da natureza do domínio Fc.

[0236] Em certas modalidades, anticorpos selecionados com uma Fc de IgG1 de camundongo foram convertidos em anticorpos com Fc de IgG1 humana. Em uma modalidade, o domínio de Fc de IgG4 compreende 2 ou mais alterações de aminoácidos, como descrito na US20100331527.

[0237] Para gerar anticorpos mutados, vários resíduos nas regiões de determinação complementares (CDRs) de H4H12166P foram mutados para histidina para gerar 9 anticorpos mutados, identificados como H4H12166P2 a H4H12166P10. Demonstrou-se que as mutações de histidina nas CDRs conferem dependência de pH da ligação ao antígeno alvo, levando à farmacocinéticas melhoradas (Igawa *et al*., 2010, Nat. Biotechnol. 28: 1203-1207).

Construções de Controle Usadas nos Seguintes Exemplos

[0238] As seguintes construções de controle (anticorpos anti-C5) foram incluídas nas experiências aqui descritas, para fins de comparação: "Comparador 1", um anticorpo monoclonal contra C5

humano tendo sequências de V_H/V_L do anticorpo "h5G1.1" de acordo com a Patente US No. 6.355.245 (Alexion Pharmaceuticals, Inc.); e "Comparador 2", um anticorpo monoclonal humano contra C5 humano possuindo sequências de V_H/V_L do anticorpo "8109" de acordo com a Publicação de Pedido de Patente US No. 2013/0022615 (Novartis).

Exemplo 3: Anticorpo ligando a C5 como determinado por Ressonância de Plasmon de Superfície

[0239] As constantes de dissociação de equilíbrio (valores de K_D) para ligação de C5 a anticorpos anti-C5 purificados foram determinadas usando um ensaio um ensaio de biossensor de ressonância de plasmon de superfície em tempo real em um instrumento Biacore T200. A superfície de sensor Biacore foi derivatizada por acoplamento de amina com um anticorpo monoclonal Fc anti-humano de camundongo monoclonal (GE Healthcare, #BR-1008-39) para capturar anticorpos anti-C5 expressos com regiões constantes Fc humanas. Os estudos de ligação Biacore foram realizados em tampão fluente de HBST (HEPES a 0,01 M pH 7,4, NaCl a 0,15 M, EDTA a 3 mM, 0,05% em v/v de Tensoativo P20). O C5 humano foi obtido de uma fonte comercial (EMD). Outros reagentes de C5 foram expressos com um marcador de myc-myc-hexa-histidina C-terminal (subsequentemente referido como C5-mmh). Reagentes de C5-mmh humanos foram também expressos contendo mutações pontuais de histidina e cisteína em arginina 885 (subsequentemente referidas como C5 R885H-mmh e C5 R885C-mmh, respectivamente). Diferentes concentrações de C5 humano, C5 R885H-mmh humano (SEQ ID NO: 356), C5 R885C-mmh humano (SEQ ID No: 357) e C5-mmh de macaco (SEQ ID NO: 358) (variando de 100 nM a 1,23 nM, diluições de 3 vezes) preparadas em tampão fluente de HBST foram injetadas sobre a superfície capturada com anticorpo anti-C5 em uma taxa de fluxo de 30 µL/min. A associação de todos os reagentes de C5 a cada um dos anticorpos monoclonais capturados foi monitorada

durante 3 minutos e a sua dissociação no tampão fluente de HBST foi monitorada durante 8 minutos. Todas as experiências de cinéticas de ligação foram realizadas em 25ºC ou 37ºC. As constantes de taxa de associação (k_a) e de dissociação (k_d) cinéticas foram determinadas ajustando-se os sensores em tempo real a um modelo de ligação de 1:1 usando o software de ajustamento de curva Scrubber 2.0c. As constantes de equilíbrio de dissociação de ligação (K_D) e as meias-vidas dissociativas (t½) foram calculadas a partir das constantes da taxa cinética como: $\boldsymbol{K_D}$ **(M) =** $\boldsymbol{k_d/k_a}$ **e t½ (min) = ln2/(60x**$\boldsymbol{k_d}$**)**

[0240] Os parâmetros cinéticos de ligação para a ligação de C5 humano aos anticorpos anti-C5 a 25°C e 37°C são apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Parâmetros cinéticos de ligação de anticorpos monoclonais anti-C5 ligando-se ao C5 humano a 25°C

Anticorpo	Quantidade de Anticorpo Capturado (RU)	100nM de C5 Humano Ligado (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	t½ (min)
H4H11683N	231	439	4,17E+05	5,14E-05	1,23E-10	225
H4H12171P	51	64	1,49E+05	8,16E-05	5,49E-10	142
H4H12161P	38	64	2,58E+05	4,37E-05	1,70E-10	264
H4H12176P2	50	96	3,36E+05	6,75E-05	2,01E-10	171
H4H12163P	51	108	6,43E+05	2,08E-04	3,24E-10	55
H4H12167P	52	116	1,09E+06	1,31E-04	1,21E-10	88
H4H12175P	51	100	2,16E+05	1,96E-04	9,10E-10	59
H4H12159P	53	118	9,75E+05	7,13E-05	7,31E-11	162
H4H12164P	52	103	2,92E+05	8,84E-05	3,02E-10	131
H4H12168P	50	113	4,23E+05	4,75E-05	1,12E-10	243
H4H12169P	51	18	2,24E+05	4,40E-04	1,96E-09	26
H4H11686N	200	341	2,20E+05	3,31E-05	1,50E-10	349
H4H12170P	51	119	5,25E+05	6,79E-05	1,29E-10	170
H4H12177P2	47	60	6,56E+04	6,29E-05	9,59E-10	184
H4H12183P2	46	50	1,66E+05	2,70E-05	1,63E-10	427
H4H12166P	53	105	6,42E+05	1,10E-04	1,71E-10	105
H4H12166P2	53	95	8,26E+05	3,61E-04	4,38E-10	32
H4H12166P3	59	124	4,03E+05	4,65E-04	1,15E-09	25
H4H12166P4	49	92	4,46E+05	1,76E-04	3,95E-10	66
H4H12166P5	59	110	2,85E+05	3,28E-04	1,15E-09	35
H4H12166P6	64	131	4,89E+05	1,84E-04	3,75E-10	63
H4H12166P7	50	92	2,74E+05	1,01E-03	3,67E-09	11
H4H12166P8	50	91	4,84E+05	6,86E-04	1,42E-09	17
H4H12166P9	52	100	3,32E+05	2,64E-04	7,94E-10	44
H4H12166P10	49	69	1,57E+05	1,32E-03	8,38E-09	9
Comparador 1	232	250	9,69E+04	1,46E-04	1,51E-09	79
Comparador 2	117	170	2,62E+05	2,39E-04	9,12E-10	48

Tabela 4: Parâmetros cinéticos de ligação de anticorpos monoclonais anti-C5 ligando-se ao C5 humano a 37°C

Anticorpo	Quantidade de Anti-corpo Capturado (RU)	100nM Human C5 Ligado (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	t½ (min)
H4H11683N	257	492	4,54E+05	2,41E-04	5,32E-10	48
H4H12171P	59	58	1,22E+05	7,62E-04	6,27E-09	15
H4H12161P	40	66	1,16E+05	1,15E-04	9,90E-10	101
H4H12176P2	38	71	1,47E+05	2,34E-04	1,59E-09	49
H4H12163P	65	139	9,11E+05	6,65E-04	7,29E-10	17
H4H12167P	75	153	1,29E+06	3,81E-04	2,95E-10	30
H4H12175P	74	132	2,96E+05	6,37E-04	2,15E-09	18
H4H12159P	70	145	1,04E+06	1,07E-04	1,03E-10	108
H4H12164P	66	140	3,96E+05	1,28E-04	3,23E-10	90
H4H12168P	34	12	2,50E+04	4,64E-04	1,85E-08	25
H4H12169P	59	65	1,15E+05	3,52E-04	3,06E-09	33
H4H11686N	206	406	3,33E+05	1,56E-04	4,69E-10	74
H4H12170P	34	55	2,97E+05	4,15E-04	1,40E-09	28
H4H12177P2	41	37	4,42E+04	5,78E-04	1,31E-08	20
H4H12183P2	29	30	4,30E+04	2,50E-04	5,81E-09	46
H4H12166P	69	127	8,80E+05	2,30E-04	2,62E-10	50
H4H12166P2	68	110	9,50E+05	1,23E-03	1,29E-09	9
H4H12166P3	86	147	6,12E+05	1,27E-03	2,07E-09	9
H4H12166P4	63	108	5,05E+05	4,69E-04	9,30E-10	25
H4H12166P5	76	129	4,40E+05	1,22E-03	2,77E-09	9
H4H12166P6	90	157	5,42E+05	4,74E-04	8,75E-10	24
H4H12166P7	64	105	3,49E+05	2,58E-03	7,39E-09	4
H4H12166P8	65	98	6,75E+05	2,09E-03	3,10E-09	6
H4H12166P9	76	122	3,75E+05	6,39E-04	1,70E-09	18
H4H12166P10	64	82	2,27E+05	3,14E-03	1,38E-08	4
Comparador 1	185	246	1,47E+05	5,30E-04	3,61E-09	22
Comparador 2	119	205	2,85E+05	6,57E-04	2,30E-10	18

[0241] C5-mmh de macaco ligando-se a anticorpos anti-C5 a 25°C e 37°C é mostrado nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5: Parâmetros Cinéticos de Ligação de anticorpos monoclonais anti-C5 ligando-se a C5-mmh de macaco a 25°C

Anticorpo	Quantidade de Anticorpo Captu-rado (RU)	100nM de C5-mmh de macaco Ligado (RU)	*ka* (1/Ms)	*kd* (1/s)	K_D (M)	t½ (min)
H4H11683N	228	403	3,86E+05	2,47E-04	6,40E-10	47
H4H12171P	51	17	4,60E+04	2,26E-04	4,92E-09	51
H4H12161P	38	45	6,33E+04	2,48E-05	3,92E-10	465
H4H12176P2	50	69	1,82E+05	5,88E-05	3,22E-10	196
H4H12163P	50	98	3,11E+05	7,75E-04	2,49E-09	15
H4H12167P	52	111	4,19E+05	1,32E-04	3,15E-10	88
H4H12175P	51	59	6,42E+04	1,65E-03	2,57E-08	7
H4H12159P	53	116	3,54E+05	4,69E-05	1,33E-10	246
H4H12164P	51	66	1,27E+05	1,53E-03	1,20E-08	8
H4H12168P	50	86	1,73E+05	1,14E-04	6,60E-10	101
H4H12169P	51	22	1,64E+05	4,55E-03	2,78E-08	3
H4H11686N	196	247	1,57E+05	4,89E-04	3,11E-09	24
H4H12170P	51	92	2,62E+05	5,21E-05	1,99E-10	222
H4H12177P2	47	32	4,62E+04	9,92E-04	2,15E-08	12
H4H12183P2	47	23	4,88E+04	4,94E-04	1,01E-08	23
H4H12166P	52	90	2,05E+05	1,06E-03	5,15E-09	11
H4H12166P2	53	71	3,00E+05	3,16E-03	1,05E-08	4
H4H12166P3	59	72	1,68E+05	4,47E-03	2,66E-08	3
H4H12166P4	49	69	2,10E+05	1,78E-03	8,50E-09	6
H4H12166P5	59	56	1,44E+05	3,46E-03	2,40E-08	3
H4H12166P6	64	94	2,39E+05	2,66E-03	1,11E-08	4
H4H12166P7	50	36	1,36E+05	6,33E-03	4,65E-08	2

H4H12166P8	50	47	2,31E+05	4,99E-03	2,16E-08	2
H4H12166P9	52	55	1,70E+05	3,18E-03	1,87E-08	4
H4H12166P10	49	15	9,56E+04	6,16E-03	6,44E-08	2
Comparador 1*	228	11	N/A	N/A	3,11E-07	N/A

N/A = não disponível; * SS = análise em estado estacionário

Tabela 6: Parâmetros Cinéticos de ligação de anticorpos monoclonais anti-C5 ligando-se a C5-mmh de macaco a 37°C

Anticorpo	Quantidade de Anticorpo Capturado (RU)	100nM de C5-mmh de macaco Ligado (RU)	*ka* (1/Ms)	*kd* (1/s)	K_D (M)	t½ (min)
H4H11683N	192	303	5,35E+05	1,15E-03	2,16E-09	10
H4H12171P	59	78	5,56E+05	1,03E-03	1,85E-09	11
H4H12161P	41	53	1,34E+05	7,45E-04	5,56E-09	16
H4H12176P2	36	47	1,35E+05	1,29E-03	9,60E-09	9
H4H12163P	64	129	3,90E+05	1,25E-03	3,20E-09	9
H4H12167P	74	146	5,37E+05	2,89E-04	5,39E-10	40
H4H12175P	74	74	1,77E+05	2,76E-03	1,56E-08	4
H4H12159P	70	137	4,12E+05	5,50E-05	1,33E-10	210
H4H12164P	65	99	1,86E+05	1,17E-03	6,30E-09	10
H4H12168P	34	29	5,33E+04	6,76E-04	1,27E-08	17
H4H12169P	59	64	2,51E+05	3,61E-03	1,43E-08	3
H4H11686N	145	195	2,33E+05	2,07E-03	8,88E-09	6
H4H12170P	34	60	5,21E+05	8,71E-04	1,67E-09	13
H4H12177P2	41	27	1,50E+05	7,17E-03	4,77E-08	2
H4H12183P2	28	13	5,40E+04	6,37E-03	1,18E-07	2
H4H12166P	68	110	2,19E+05	1,87E-03	8,55E-09	6
H4H12166P2	68	83	3,93E+05	2,97E-03	7,56E-09	4
H4H12166P3	85	92	2,23E+05	2,92E-03	1,31E-08	4
H4H12166P4	62	80	2,23E+05	1,83E-03	8,20E-09	6
H4H12166P5	75	70	1,50E+05	3,13E-03	2,09E-08	4
H4H12166P6	90	112	2,53E+05	2,32E-03	9,18E-09	5
H4H12166P7	63	48	1,25E+05	2,41E-03	1,93E-08	5
H4H12166P8	64	53	2,03E+05	2,69E-03	1,33E-08	4
H4H12166P9	75	69	1,81E+05	2,61E-03	1,44E-08	4
H4H12166P10	63	24	6,60E+04	2,79E-03	4,22E-08	4
Comparador 1	132	4	NB	NB	NB	NB

[0242] C5 R885H-mmh humano e C5 R885C-mmh humano ligando-se a anticorpos anti-C5 a 25°C são mostrados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7: Parâmetros Cinéticos de Ligação de anticorpos monoclonais anti-C5 ligndo-se a C5 R885H-mmh humano a 25°C

Anticorpo	Quantidade de Anticorpo Capturado (RU)	100nM de C5 R885H-mmh humano Ligado (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	t½ (min)
H4H11683N	183	118	5,26E+05	2,46E-04	4,68E-10	47
H4H12171P	119	51	6,59E+05	1,42E-04	2,16E-10	81
H4H12161P	105	199	8,36E+04	8,32E-05	9,96E-10	139
H4H12176P2	170	65	1,78E+05	2,17E-04	1,22E-09	53
H4H12163P	111	214	6,72E+05	4,34E-04	6,46E-10	27
H4H12167P	93	187	6,89E+05	2,98E-04	4,33E-10	39
H4H12175P	104	207	1,81E+05	1,98E-03	1,09E-08	6
H4H12159P	101	177	7,06E+05	1,76E-04	2,50E-10	66
H4H12164P	143	295	1,58E+05	1,87E-04	1,19E-09	62
H4H12168P	138	197	5,29E+04	2,14E-04	4,05E-09	54
H4H12169P	116	173	4,84E+05	7,09E-05	1,47E-10	163
H4H11686N	145	259	2,16E+05	1,06E-04	4,91E-10	109
H4H12170P	244	442	4,09E+05	1,61E-04	3,94E-10	72
H4H12177P2	137	232	1,48E+05	5,92E-04	4,01E-09	20
H4H12183P2	158	99	3,77E+04	4,37E-05	1,16E-09	264

H4H12166P	188	366	5,28E+05	2,12E-04	4,02E-10	54
Comparador 1	87	11	NB	NB	NB	NB
Comparador 2	118	249	1,08E+06	6,53E-04	6,06E-10	18

Tabela 8: Parâmetros Cinéticos de Ligação de anticorpos monoclonais anti-C5 ligando-se a C5 R885C-mmh humano a 25°C

Anticorpo	Quantidade de Anticorpo Capturado (RU)	100nM de C5 R885C-mmh humano Ligado (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	t½ (min)
H4H11683N	174	116	4,99E+05	2,39E-04	4,79E-10	48
H4H12171P	109	51	3,79E+05	1,39E-04	3,66E-10	83
H4H12161P	103	147	1,30E+05	8,71E-05	6,72E-10	133
H4H12176P2	164	63	1,07E+05	2,18E-04	2,03E-09	53
H4H12163P	110	211	5,04E+05	4,32E-04	8,58E-10	27
H4H12167P	85	163	7,11E+05	2,94E-04	4,13E-10	39
H4H12175P	99	128	8,18E+04	1,55E-02	1,90E-07	1
H4H12159P	93	168	5,86E+05	1,69E-04	2,89E-10	68
H4H12164P	139	249	1,53E+05	1,82E-04	1,19E-09	63
H4H12168P	128	144	6,09E+04	1,99E-04	3,27E-09	58
H4H12169P	108	168	2,78E+05	6,99E-05	2,51E-10	165
H4H11686N	143	253	1,78E+05	9,49E-05	5,34E-10	122
H4H12170P	244	427	3,57E+05	1,60E-04	4,47E-10	72
H4H12177P2	138	177	1,00E+05	1,32E-03	1,32E-08	9
H4H12183P2	158	80	2,99E+04	2,20E-05	7,37E-10	525
H4H12166P	188	356	4,26E+05	2,07E-04	4,87E-10	56
Comparador 1	87	9	NB	NB	NB	NB
Comparador 2	117	241	1,17E+06	6,19E-04	5,30E-10	19

[0243] C5 R885H-mmh humano e C5 R885C-mmh humano ligando-se a anticorpos anti-C5 a 37°C são mostrados nas Tabelas 9 e 10, respectivamente.

Tabela 9: Parâmetros Cinéticos de ligação de anticorpos monoclonais anti-C5 ligando-se ao C5 R885H-mmh humano a 37ºC

Anticorpo	Quantidade de Anticorpo Capturado (RU)	100nM de C5 R885H-mmh humano Ligado (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	t½ (min)
H4H11683N	49	81	5,48E+05	1,47E-03	2,69E-09	8
H4H12171P	59	80	5,92E+05	9,63E-04	1,63E-09	12
H4H12161P	41	54	1,18E+05	9,25E-04	7,84E-09	12
H4H12176P2	45	69	2,57E+05	9,58E-04	3,73E-09	12
H4H12163P	60	85	7,24E+05	2,90E-03	4,00E-09	4
H4H12167P	38	65	8,81E+05	2,57E-03	2,91E-09	5
H4H12175P	25	30	1,37E+05	9,50E-03	6,94E-08	1
H4H12159P	51	82	6,38E+05	9,48E-04	1,49E-09	12
H4H12164P	59	68	1,95E+05	1,06E-03	5,46E-09	11
H4H12168P	34	29	2,43E+04	1,23E-03	5,04E-08	9
H4H12169P	61	79	4,29E+05	7,39E-04	1,72E-09	16
H4H11686N	40	74	4,19E+05	8,00E-04	1,91E-09	14
H4H12170P	36	64	5,59E+05	8,39E-04	1,50E-09	14
H4H12177P2	45	51	2,76E+05	2,76E-03	1,00E-08	4
H4H12183P2	33	36	9,58E+04	7,12E-04	7,43E-09	16
H4H12166P	71	58	6,24E+05	1,31E-03	2,09E-09	9
Comparador 1	41	5	NB	NB	NB	NB
Comparador 2	23	47	8,39E+05	1,05E-03	1,25E-09	11

Tabela 10: Parâmetros Cinéticos de ligação de anticorpos monoclonais anti-C5 ligando-se a C5 R885C-mmh humano a 37°C

Anticorpo	Quantidade de Anti-corpo Capturado (RU)	100nM de C5 R885C-mmh humano Ligado (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	t½ (min)
H4H11683N	48	78	4,38E+05	1,43E-03	3,25E-09	8
H4H12171P	59	78	4,77E+05	9,57E-04	2,01E-09	12
H4H12161P	41	49	1,10E+05	9,01E-04	8,17E-09	13
H4H12176P2	44	55	1,41E+05	1,03E-03	7,32E-09	11
H4H12163P	59	83	5,66E+05	2,81E-03	4,97E-09	4
H4H12167P	38	64	6,84E+05	2,49E-03	3,64E-09	5
H4H12175P	25	4	1,12E+05	1,79E-02	1,59E-07	1
H4H12159P	51	68	5,61E+05	9,75E-04	1,74E-09	12
H4H12164P	59	64	1,77E+05	1,04E-03	5,85E-09	11
H4H12168P	34	21	6,38E+04	5,69E-04	8,90E-09	20
H4H12169P	61	75	3,29E+05	7,37E-04	2,24E-09	16
H4H11686N	39	69	2,84E+05	7,91E-04	2,78E-09	15
H4H12170P	36	61	4,24E+05	8,70E-04	2,05E-09	13
H4H12177P2	43	31	1,07E+05	5,07E-03	4,76E-08	2
H4H12183P2	31	25	5,12E+04	9,97E-04	1,95E-08	12
H4H12166P	72	54	4,91E+05	1,26E-03	2,56E-09	9
Comparador 1	41	2	NB	NB	NB	NB
Comparador 2	23	42	7,34E+05	1,07E-03	1,45E-09	11

[0244] A 25°C, todos os 25 anticorpos anti-C5 da invenção ligados a C5 humano com valores de K_D variando de 73 pM a 8,4 nM, como mostrado na Tabela 3. A 37°C, os anticorpos anti-C5 da invenção ligaram-se a C5 humano com valores de K_D variando de 103 pM a 18,5 nM, como mostrado na Tabela 4. A 25, 25 dos 25 anticorpos anti-C5 da invenção testados ligaram-se a C5-mmh de macaco com valores de K_D variando de 133 pM a 64 nM como mostrado na Tabela 5. A 37°C, 25 dos 25 anticorpos anti-C5 da invenção testados ligaram-se a C5-mmh de macaco com valores de K_D variando de 133 pM a 118 nM, como mostrado na Tabela 6. A 25°C, 16 dos 16 anticorpos anti-C5 da invenção testados ligaram-se a C5 R885H-mmh humano com valores de K_D variando de 147 pM a 10,9 nM, como mostrado na Tabela 7. A 25°C, 16 dos 16 anticorpos anti-C5 da invenção testados ligaram-se a C5 R885C-mmh humano com valores de K_D variando de 251pM a 190nM, como mostrado na Tabela 8. A 37°C, 16 dos 16 anticorpos anti-C5 da invenção testados ligaram-se a C5 R885H-mmh humano com valores de K_D variando de 1,49 nM a 69,4 nM como mostrado na Tabela 9. A 25°C, 16 dos 16 anticorpos anti-C5 da invenção testados ligaram-se a C5 R885C-mmh humano com valores de K_D variando de 1,74 nM

a 159 nM, como mostrado na Tabela 10.

Exemplo 4: Anticorpo ligando-se a C5 por pH diferente

[0245] O efeito do pH sobre a taxa de dissociação de C5 humano recombinante ligado a anticorpos monoclonais anti-C5 purificados foi determinado usando um biossensor de ressonância de plasmon de superfície em tempo real usando um instrumento Biacore T200. A superície de sensor Biacore foi primeiro derivatizada por acoplamento de amina com um anticorpo Fc anti-humano de camundongo monoclonal (GE, # BR-1008-39) para capturar anticorpos monoclonais anti-C5 expressos com Fc de IgG1 humana. Todos os estudos de ligação Biacore foram realizados usando dois tampões fluentes PBS-T, pH 7,4 (Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 a 0,001M, NaCl a 0,15 M, Tween-20 a 0,05% em v/v, ajustado para pH 7,4) e PBS-T, pH6,0, (Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 a 0,01 M, NaCl a 0,15M, Tween-20 a 0,05% em v/v, ajustado para pH 6,0). Diferentes concentrações de C5 humano (EMD, N.º de Catálogo # 204888) ou C5.mmh de macaco (preparado em PBS-T, tampão fluente em pH 7,4 (variando de 100 nM a 11,11 nM, diluições de 3 vezes) foram injetadas sobre a superfície capturada de anticorpo monoclonal anti-C5 durante 3 minutos em uma taxa de fluxo de 50 µL/minuto e a sua dissociação em dois tampões fluentes PBS-T, pH 7,4 e PBS-T, pH 6,0 foi monitorada durante 6 minutos. Todas as experiências cinéticas de ligação foram realizadas a 25°C e 37°C. A constante de dissociação cinética (k_d) foi determinada ajustando os sensores em tempo real em um modelo de ligação de 1:1 usando software de ajustamento de curva Scrubber 2.0c. As meias-vidas dissociativas de ligação (t½) foram calculadas a partir de *kd* como:

$$\mathbf{t½\ (min) = \frac{ln(2)}{60 * kd}}$$

[0246] As relações de meia-vida para a ligação de C5 humano a anticorpos monoclonais anti-C5 diferentes a 25°C e 37°C em dois tampões fluentes PBS-T, pH7,4 e PBS-T, pH6,0 são mostradas nas

Tabelas 11 e 12.

Tabela 11: Relações de meia-vida de anticorpos anti-C5 selecionados para C5 humano a 25°C

mAb Capturado	Relação t½
	pH7,4/pH6,0
H4H12169P	IC
H4H12176P2	IC
H4H12161P	IC
H4H12159P	≤ 0,3
H4H12170P	≤ 0,5
H4H12166P	4,5
H4H12183P2	IC
H4H12167P	0,6
H4H12164P	0,3
H4H12163P	1,2
H4H12175P	0,9
H4H12177P2	≤ 0,5
H4H12171P	0,6
H4H12168P	1,5
H4H12166P2	9,3
H4H12166P3	7,9
H4H12166P4	7,8
H4H12166P5	8,3
H4H12166P6	7,8
H4H12166P7	35
H4H12166P8	47
H4H12166P9	31
H4H12166P10	33
H4H11683N	2
H4H11686N	2

IC = inconclusivo

Tabela 12: Relações de meia-vida de anticorpos anti-C5 selecionados em C5 humano a 37°C

mAb Capturado	**Relação de t½**
	pH7,4/pH6,0
H4H12169P	IC
H4H12176P2	≤ 0,4
H4H12161P	≤ 0,7
H4H12159P	≤ 0,2
H4H12170P	≤ 0,2
H4H12166P	3,8
H4H12183P2	IC
H4H12167P	0,2
H4H12164P	≤ 0,1
H4H12163P	0,8
H4H12175P	0,9
H4H12177P2	1,3
H4H12171P	3,7
H4H12168P	1
H4H12166P2	7,3
H4H12166P3	6,6

H4H12166P4	7,6
H4H12166P5	7,6
H4H12166P6	8,2
H4H12166P7	21
H4H12166P8	36
H4H12166P9	28
H4H12166P10	19
H4H11683N	1,4
H4H11686N	0,8

IC = inconclusivo

[0247] Relações de meia-vida para ligação de C5 de macaco em diferentes anticorpos monoclonais anti-C5 a 25°C e 37°C em dois tampões fluentes PBS-T, pH7,4 e PBS-T, pH6,0 são mostradas nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13: Relações de meia-vida dos anticorpos anti-C5 selecionados no C5 de macaco a 25°C

mAb Capturado	**Relação de t½**
	pH7,4/pH6,0
H4H12169P	3,4
H4H12176P2	≥ 9,1
H4H12161P	IC
H4H12159P	1,2
H4H12170P	≥ 1,7
H4H12166P	18,5
H4H12183P2	5,8
H4H12167P	9,2
H4H12164P	2,9
H4H12163P	9,7
H4H12175P	3,6
H4H12177P2	3,7
H4H12171P	2,1
H4H12168P	3,8
H4H11683N	0,34
H4H11686N	0,37

IC = inconclusivo

Tabela 14: Relações de meia-vida dos anticorpos anti-C5 selecionados no C5 de macaco a 37°C

mAb Capturado	**Relação de t½**
	pH7,4/pH6,0
H4H12169P	2
H4H12176P2	2,8
H4H12161P	10,7
H4H12159P	6,3
H4H12170P	4,7
H4H12166P	7,1
H4H12183P2	2,4
H4H12167P	4,4
H4H12164P	1,1

H4H12163P	3,3
H4H12175P	0,4
H4H12177P2	1,5
H4H12171P	4,7
H4H12168P	4
H4H11683N	0,7
H4H11686N	0,5

IC = inconclusivo

[0248] Como mostrado nas Tabelas 11-14, os anticorpos anti-C5 selecionados mostraram ligação dependente do pH, como visto pelas relações de t½.

Exemplo 5: Competição cruzada de Octet entre anticorpos anti-C5

[0249] A competição de ligação entre os anticorpos monoclonais anti-C5 (mAbs) foi determinada usando um ensaio de interferometria em bio-camada sem rótulo, em tempo real em um biossensor Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.). Toda a experiência foi realizada a 25°C em HEPES a 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, 0,05% em v/v de Tensoativo Tween-20, BSA 0,1 mg/mL (tampão Octet HBS-P) com a placa em agitação na velocidade de 1000 rpm. Para avaliar se 2 anticorpos eram capazes de competir uns com os outros pela ligação aos seus respectivos epítopos em um C5 humano (hC5 purificado a partir do plasma, EMD), cerca de 1,5 nm de mAb de C5 anti-humano foi capturado primeiro em extremidades de biossensor de Octet revestido com anticorpo anti-hFc (Pall ForteBio Corp., # 18-5060) submergindo as extremidades durante 3 minutos em cavidades contendo uma solução de 50 µg/mL de mAb de C5 anti-humano (subsequentemente referido como mAb1). As extremidades do biossensor capturadas com anticorpo foram, então, saturadas com um mAb de controle de isótipo H4H de bloqueio (subsequentemente referido como mAb de bloqueio) por imersão em cavidades contendo 200 µg/mL de solução de mAb de bloqueio durante 4 minutos. As extremidades do biossensor foram, então, subsequentemente imersas em cavidades contendo uma solução cocomplexada de 50 nM de hC5 e 1 µM de um segundo mAb de C5 anti-humano (subsequentemente referido como mAb2), que tinha

sido pré-incubado durante 2 horas, por 4 minutos. As extremidades do biossensor foram lavadas em tampão de Octet HBS-P entre cada etapa da experiência. A resposta de ligação em tempo real foi monitorada durante o decurso da experiência e a resposta de ligação no final de cada etapa foi registada. A resposta de mAb2 pré-complexa de C5 humano ligando-se ao mAb1 foi corrigida para a ligação antecedente, comparada e o comportamento competitivo/não competitivo de diferentes anticorpos monoclonais anti-C5 foi determinado.

[0250] A Tabela 15 define explicitamente as relações de anticorpos que competem em ambas as direções, independentemente da ordem de ligação.

Tabela 15: Competição cruzada entre pares de anticorpos anti-C5 selecionados

Primeiro mAb (mAb1) Capturado using Biossensores de AHC Octet	**Anticorpos de mAb2 Mostrado para Competir com mAb1**
H4H12183P2	H4H12167P; H4H12166P; H4H12163P
H4H12167P	H4H12183P2; H4H12166P; H4H12163P
H4H12166P	H4H12183P2; H4H12167P; H4H12163P
H4H12163P	H4H12183P2; H4H12167P; H4H12166P
H4H12159P	H4H12169P; H4H11683N; H4H12170P
H4H12169P	H4H12159P; H4H11683N; H4H12170P
H4H11683N	H4H12159P; H4H12169P; H4H12170P
H4H12170P	H4H12159P; H4H12169P; H4H11683N
H4H12175P	H4H12177P2
H4H12177P2	H4H12175P
H4H12176P2	H4H12164P
H4H12164P	H4H12176P2
H4H12168P	nenhum
H4H12161P	Nenhum
H4H11686N	nenhum

Exemplo 6: Inibição da citotoxicidade dependente de complemento mediada por C5 em um bioensaio de células B

[0251] Este exemplo descreve um bioensaio para testar o papel de C5 usando um anticorpo anti-CD20 na trilha de complemento clássica. Foi demonstrado que os anticorpos anti-CD20 terapêuticos contra o antígeno de superfície celular específico de célula B CD20, mostraram conduzir para CDC de células B (Glennie *et al*. 2007, Mol. Immunol. 44: 3823-3837) e ensaio de CDC usando linhagens celulares expressando

CD20 foram descritas previamente (Flieger *et al*. 2000, Cell. Immunol. 204: 55-63). Células Daudi, uma linhagem de célula B humana expressando CD20, soro preservado complementar ou soro esgotado de C5 com variantes de C5 exógenas e um anticorpo anti-CD20 (anticorpo compreendendo VH/VL de "2F2" de Patente US 8.529.902) foram usados para avaliar o papel da atividade de C5 no CDC.

[0252] Para o bioensaio de CDC de C5, as células Daudi foram semeadas em placas de ensaio de 96 cavidades em 10.000 células/cavidade em RPMI contendo 10% de FBS, penicilina/estreptomicina, L-glutamina, piruvato de sódio e Aminoácidos Não Essenciais (meios de RPMI Completos) ou RPMI contendo 1% de BSA, penicilina/estreptomicina e L-glutamina (RPMI/BSA). Todos os ensaios que testaram anticorpos anti-hC5 mutados, juntamente com o teste dos anticorpos não mutados com soro humano contendo C5 foram testados em meios RPMI Completos, enquanto os ensaios testado os anticorpos não mutados com soro de macaco Afrian Green e variantes C5 humanas foram testados em meios RPMI/BSA. Para medir a CDC com soro humano ou de macaco, o anticorpo anti-CD20 foi diluído 1:3 de 100 nM para 2 pM (incluindo uma amostra de controle sem anticorpo) e incubado com células durante 10 minutos a 25°C seguido pela adição de soro a 1,66% ou 1,66% de soro esgotado de C5 e de proteínas variante de C5 de 6,6 nM. A quantidade de proteína C5 a ser adicionada ao soro esgotado de C5 foi baseada no valor relatado da concentração de C5 no soro humano de 0,37 uM (Rawal *et al*., 2008, J. Biol. Chem. 283: 7853-7863). Para testar a inibição de anticorpo de C5 de CDC, os anticorpos de C5 foram diluídos 1:3 de 100 nM para 2 pM (incluindo uma amostra de controle sem anticorpo) e incubados com soro a 1,66% ou 1,66% de soro esgotado de C5 e 6,6nM de variante de C5 durante 30 minutos. Dez minutos antes da adição de anticorpos com soro às células, o anticorpo anti-CD20 foi adicionado às células em 1 nM, 2 nM,

3 nM, 3,5 nM, 7 nM, 10 nM ou 30 nM. No final da incubação com o anticorpo anti-CD20, a mistura de anticorpo/soro foi adicionada às células. A citotoxicidade foi medida após 3,5 horas de incubação a 37°C e em 5% de CO_2, seguido por 15 minutos de incubação a 25°C e adição de reagente CytoTox-Glo™ (Promega, # G9292). O CytoTox-Glo™ é um reagente à base de luminescência que mede a morte celular de tal forma que a luminescência aumentada é observada com citotoxicidade aumentada (medida em unidades de luz relativas, RLUs). As células não tratadas nas cavidades de controle foram lisadas por tratamento com digitonina imediatamente após a adição do reagente CytoTox-Glo™ para determinar a morte máxima das células. As placas foram lidas por luminescência por um instrumento Victor X (Perkin Elmer) 15 minutos após a adição de CytoTox-Glo™. Quando calculada, a percentagem da citotoxicidade foi calculada com os valores de URL, usando a seguinte equação:

$$\% \text{ de Citotoxicidade} = 100 \times \frac{(\text{Lise Celular Experimental} - \text{Lise Celular de Base})}{(\text{Lise Celular Máxima} - \text{Lise Celular de Base})}$$

[0253] Nesta equação, a "lise celular de base" é a luminescência das células tratadas com meios e soro apenas sem qualquer anticorpo anti-CD20 e a "lise celular máxima" é a luminescência das células tratadas com digitonina. Os resultados, expressos como% de citotoxicidade ou RLUs, foram analisados usando regressão não linear (logísticas de 4 parâmetros) com o software Prism 5 (GraphPad) para obter os valores de EC_{50} e IC_{50}. A inibição de anticorpos foi calculada de tal modo que 0 - 100% de inibição é a faixa de inibição da concentração do anticorpo anti-CD20 usado no ensaio sem inibidor do anticorpo anti-CD20 de 0nM.

Resultados

[0254] Um total de 25 anticorpos de C5 anti-humanos, 16 não mutados e 9 mutados, foram testados quanto à sua capacidade de inibir C5 no ensaio de CDC usando células Daudi com um anticorpo anti-

CD20 e soro humano (com hC5 normal ou variantes de C5) ou soros de macaco Afrian Green. Vários resíduos nas regiões de determinação da complementaridade (CDRs) de H4H12166P foram mutados para histidinas para gerar 9 anticorpos mutados, H4H12166P2-H4H12166P10. Mostrou-se que as mutações de histidina nas CDRs conferem dependência de pH da ligação ao antígeno alvo, conduzindo a farmacocinética melhorada (Igawa *et al*., 2010, Nat. Biotechnol. 28: 1203-1207).

Tabela 16: Inibição de anticorpo anti-hC5 não mutado de CDC com soro a 1,66% e anticorpo anti-CD20 em células Daudi

Sero	**Humano**	**Humano**	**Macaco *African Green***	**Variante de 6,6 nM de C5 e Humana Esgotada de C5 R885H**	**Variante de 6,6 nM de C5 e Humana Esgotada de C5 R885C**
EC50 [M] de anticorpo anti-CD20 (com 1,66% de Soro)	**1,0E-09**	**1,4E-09**	**2,4E-09**	**1,9E-09**	**2,7E-09**
Constante de anticorpo anti-CD20 (com 1,66% de soro)	**1nM**		**3nM**	**3,5nM**	**30nM**
Anticorpo	**IC_{50} [M]**		**IC_{50} [M] (% de Inibição Máx,)***	**IC_{50} [M]**	**IC_{50} [M] (% de Inibição Máx,)***
H4H11683N	Não Testado	1,2E-09	4,0E-09	1,3E-09	9,0E-10
H4H11686N	Não Testado	1,5E-09	4,4E-09	1,1E-09	4,5E-10
H4H12159P	3,2E-09	Não Testado	3,4E-09	1,4E-09	1,0E-09
H4H12161P	2,4E-09	Não Testado	2,6E-09	1,8E-09	1,0E-09
H4H12163P	3,4E-09	Não Testado	3,7E-09	2,1E-09	1,1E-09
H4H12164P	2,4E-09	Não Testado	5,8E-09	1,8E-09	8,2E-10
H4H12166P	2,6E-09	Não Testado	4,5E-09	1,3E-09	4,6E-10
H4H12167P	2,5E-09	Não Testado	3,5E-09	1,9E-09	1,0E-09
H4H12168P	1,5E-09	Não Testado	2,0E-09	2,3E-09	8,6E-10
H4H12169P	1,7E-09	Não Testado	2,9E-09	1,3E-09	6,7E-10
H4H12170P	2,0E-09	Não Testado	3,7E-09	4,8E-10	4,3E-10
H4H12171P	1,9E-09	Não Testado	3,3E-09	1,6E-09	6,5E-10
H4H12175P	2,2E-09	Não Testado	5,2E-09	4,2E-09	>2,0E-08 (67%)
H4H12176P2	2,7E-09	Não Testado	3,5E-09	2,1E-09	1,3E-09
H4H12177P2	2,2E-09	Não Testado	6,1E-09	2,4E-09	1,6E-09
H4H12183P2	1,7E-09	Não Testado	1,4E-08	1,2E-09	4,5E-10
Comparador 1	2,3E-09	1,8E-09	>9,0E-08 (49%)	No inhibition	No inhibition
mAb de Controle 1	Nenhuma inibição	Nenhuma inibição	Não Testado	Não Testado	Não Testado
mAb de Controle 2	Não Testado	Não Testado	Nenhuma inibição	Nenhuma inibição	Nenhuma inibição

*A menos que de outra maneira notado, toda a inibição é de ~ 100%

[0255] Como mostrado nas Tabelas 16 e 17, todos os 25 anticorpos anti-hC5 mostraram inibição completa de CDC mediada por C5 presente em 1,66% do soro humano. As IC_{50} dos anticorpos não mutados variaram de 1,2 a 3,4 nM. As IC_{50} dos anticorpos mutados variaram de 3,0nM a 12nM. O anticorpo parental, não mutado, H4H12166P produziu inibição completa com IC50s de 2,6 nM e 2,9 nM.

Tabela 17: Inibição de anticorpo anti-hC5 mutado de CDC com

1,66% de soro e anticorpo anti-CD20 em células Daudi

Sero	**Humano**	**Macaco *African Green***	**Variante de 6,6 nM de C5 e Humana Esgotada de C5 R885H**	**Variante de 6,6 nM de C5 e Humana Esgotada de C5 R885C**
EC50 [M] de anticorpo anti-CD20 (com 1,66% de Soro)	**1,9E-09**	**2,6E-09**	**6,3E-09**	**9,5E-09**
Constante de anticorpo anti-CD20 (com 1,66% de soro)	**2nM**	**10nM**	**7nM**	**30nM**
Anticorpo	**IC_{50} [M]**	**IC_{50} [M] (% de Inibição Máx,)***	**IC_{50} [M]**	**IC_{50} [M]**
H4H12166P	2,9E-09	5,6E-09	1,3E-09	7,6E-10
H4H12166P2	3,7E-09	9,7E-09	1,7E-09	1,2E-09
H4H12166P3	7,8E-09	>3,0E-08 (64%)	2,9E-09	1,7E-09
H4H12166P4	3,5E-09	7,9E-09	1,5E-09	9,6E-10
H4H12166P5	4,9E-09	>3,0E-08 (75%)	2,1E-09	1,4E-09
H4H12166P6	3,0E-09	9,9E-09	1,3E-09	7,9E-10
H4H12166P7	7,3E-09	>6,0E-08 (61%)	4,2E-09	2,3E-09
H4H12166P8	4,1E-09	>2,0E-08 (79%)	2,1E-09	1,2E-09
H4H12166P9	3,9E-09	>1,0E-08 (85%)	1,7E-09	7,7E-10
H4H12166P10	1,2E-08	>1,0E-07 (34%)	7,0E-09	3,5E-09
Comparador 1	2,7E-09	>1,0E-07 (35%)	Nenhuma inibição	Nenhuma inibição
mAb de Controle 2	Nenhuma inibição	Nenhuma inibição	Nenhuma inibição	Nenhuma inibição

*A menos que de outra maneira notado, toda a inibição é de ~ 100%

[0256] Os dezesseis anticorpos anti-hC5 não mutados mostraram inibição completa de CDC mediada por C5 de macaco *African Green* com as IC_{50} variando de 2,0 nM a 14 nM.

[0257] Quatro dos 9 anticorpos mutados mostraram inibição completa de CDC mediada pelo macaco *African Green* C5 com as IC_{50} variando de 7,1 nM a 9,9 nM. Os seis anticorpos mutados restantes foram bloqueadores com as IC_{50} superiores a 10 nM e inibição mínima (em 100 nM de anticorpo) variando de 34% a 85%. O anticorpo parental, não mutado, H4H12166P produziu inibição completa com IC50s de 4,5 nM e 5,6 nM.

[0258] Para testar se os anticorpos anti-hC5 inibem as variantes C5 humanas, R885H e R885C, o Soro Humano Esgotado de C5 foi testado com 6,6 nM de cada variante de C5. Todos os 25 anticorpos anti-hC5 apresentaram inibição completa de CDC mediada pela variante de C5 R885H, com IC50s dos anticorpos não mutados variando de 0,48 nM a 4,2 nM, enquanto IC50s dos anticorpos mutados variaram de 1,3 nM a 7,0 nM. O anticorpo parental, não mutado, H4H12166P produziu inibição completa com IC50s de 1,3 nM e 1,3 nM.

[0259] Quinze dos 16 anticorpos anti-hC5 não mutados

apresentaram inibição completa da CDC mediada pela variante de C5 R8855C, com IC50s variando de 0,43 nM a 1,6 nM. Um anticorpo não mutado mostrou fraca inibição de CDC com inibição máxima de 67% (em 100 nM de anticorpo) e uma IC50 > 20 nM. Todos os nove anticorpos mutados mostraram inibição completa de CDC mediada pela variante de C5 R885C com IC50s variando de 0,77 nM a 3,5 nM. O anticorpo parental, não mutado, H4H12166P produziu inibição completa com uma CI50s de 0,46 nM e 0,76 nM.

[0260] O anticorpo anti-CD20 mostrou CDC de células Daudi com soro a 1,66% com EC50s de 1,0 nM, 1,4 nM e 1,9 nM para soro humano, 2,4 nM e 2,6 nM para soro de macaco *African Green*, 1,9 nM e 6,3 nM para soro esgotado de hC5 com a variante de hC5 R885H e 2,7 nM e 9,5 nM para o soro esgotado de hC5 com a variante de hC5 R885C. Nenhum dos anticorpos de controle de IgG irrelevantes, mAb1 de Controle e mAb2 de Controle, demonstraram qualquer inibição de CDC.

Exemplo 7: Inibição da atividade de C5a como determinado pelo ensaio de luciferase

[0261] Este exemplo descreve um ensaio para testar a ativação de C5a através de um de seus receptores, C5aR1. C5aR1 é um receptor acoplado à proteína G (GPCR) e pode iniciar várias trilhas de sinalização acopladas a GPCR (Monk *et al*., 2007, Br. J. Pharmacol. 152: 429-448). Um bioensaio foi estabelecido usando células HEK293 estavelmente transfectadas com C5aR1 humano (No. de acesso NP_001727.1) e Gα16 humano (No. de Acesso NP_002059.3) juntamente com um repórter de luciferase [elemento de resposta NFAT (4X)-luciferase]. Gα16 é uma proteína G relativamente promíscua que pode se acoplar a diferentes tipos de GPCRs levando à ativação de PLC-β e subsequente elevação de Ca^{++}, que por sua vez ativa a translocação de NFAT e a transcrição do gene repórter (Kostenis *et al*. 2005, Trends Pharmacol. Sci. 26: 595-602). A linhagem celular

resultante, HEK293/hGα16/hC5aR1/NFAT-luc, foi isolada e mantida em 10% de DMEM contendo 10% de FBS, NEAA, penicilina/estreptomicina, 500µg/mL de G418, 100 µg/mL de higromicina B e 7µg/mL de blasticidina.

[0262] Para o bioensaio de luciferase de C5a, células HEK293/hG□16/hC5aR1/NFAT-luc foram semeadas em placas de ensaio de 96 cavidades em 20.000 células/cavidade em OPTIMEM (Invitrogen, # 31985-070) suplementadas com BSA a 0,5%, penicilina/estreptomicina e L-glutamina, e depois incubadas a 37ºC e 5% de CO_2 durante a noite. Utilizou-se BSA em vez de FBS, uma vez que se demonstrou que o soro clivava e inativava hC5a (Klos *et al*., 2013, Pharmacol. Rev. 65: 500-543). Na manhã seguinte, o hC5a foi titulado de 100 nM a 2 pM (incluindo uma amostra de controle não contendo hC5a) e adicionado ás células para determinar a curva de titulação de resposta à dose para a linhagem celular. Para testar a inibição de anticorpo de hC5a de hC5a, adicionaram-se 500pM de hC5a às células. Imediatamente a seguir, os anticorpos diluídos 1:3 de 100 nM a 2 pM (incluindo uma amostra de controle não contendo anticorpo) foram adicionados às células. As células foram incubadas durante 5,5 horas a 37°C na presença de 5% de CO_2. A atividade de luciferase foi detectada após a incubação com o reagente OneGlo™ (Promega, # E6051). O OneGlo™ é um reagente baseado em luminescência que mede a quantidade de luciferase presente nas células. Neste ensaio, a ativação de hC5a aumentada leva à produção de luciferase e luminescência aumentadas (medidas em unidades de luz relativas, RLUs). A medição da luminescência foi realizada usando um instrumento Victor X (Perkin Elmer). Os resultados foram analisados usando regressão não linear (logísticas de 4 parâmetros) com o software Prism 5 (GraphPad) para obter os valores de EC_{50} e IC_{50}. A inibição de anticorpos foi calculada de tal modo que 0 - 100% de inibição

é a faixa de inibição de 500 pM de hC5a sem inibidor para 0 nM de hC5a.

[0263] Quatro anticorpos anti-hC5 foram testados quanto à sua capacidade de inibir a ativação de hC5a de seu receptor, hC5aR1, medindo a extensão da inibição da ativação de 500pM de hC5a de células HEK293/hGα16/hC5aR1/NFAT-luc.

Tabela 18: Inibição do anticorpo anti-hC5 de 500 pM de hC5a em células HEK293/G□16/hC5aR1/NFAT-luc

EC_{50}[M] hC5a	**3,9E-10**
PID de mAb ou REGN #	**Inibição de 500pM hC5a**
	IC_{50} [M]
H2aM11682N	4,6E-10
H2aM11684N	3,5E-11
H2aM11694N	1,4E-10
H2aM11695N	4,2E-11
mAb de Controle	Nenhuma inibição

[0264] Como mostrado na Tabela 18, todos os quatro anticorpos da invenção mostraram inibição completa de 500pM de hC5a com IC50s variando de 0,035nM a 0,46nM. Um anticorpo de controle de IgG Irrelevante, mAb3 de Controle, não demonstrou qualquer inibição de hC5a. hC5a ativou as células HEK293/Gα16/hC5aR1/NFAT-luc com uma EC50 de 0,39 nM.

Exemplo 8: Bioensaio de Hemólise

[0265] O ensaio de hemólise da trilha clássica (CH) e o ensaio de hemólise da trilha alternativa (AH) foram desenvolvidos para testar a atividade do anticorpo.

[0266] A CH é um ensaio de avaliação para a ativação da trilha clássica complementar clássica, que é sensível à diminuição, ausência e/ou inatividade de qualquer componente da trilha. A CH testa a capacidade funcional dos componentes complementares séricos da trilha clássica para lisar os glóbulos vermelhos de ovelha (SRBC) pré-revestidos com anticorpo de coelho anti-ovelha para glóbulos vermelhos (hemolisina). Quando as SRBC revestidas com anticorpo são incubadas com soro teste, a trilha clássica do complemento é ativada e resulta em

hemólise. Se um componente complementar estiver ausente, o nível de CH será zero; se um ou mais componentes da trilha clássica estiverem diminuídos, a CH será diminuída. (Nilsson *et al*. 1984, J. Immunol. Meth. 72: 49-59). Este ensaio é usado para caracterização e avaliação de anticorpos C5 anti-humanos de alta afinidade.

Métodos

(A) Ensaio de hemólise de complemento de trilha clássica

[0267] O número desejado de glóbulos vermelhos de ovelha (SRBCs) foi lavado em tampão GVB++ e novamente suspenso em 1x10^9 células/mL. Para sensibilizar os glóbulos vermelhos, misturaram-se volumes iguais de hemolisina diluída anti-ovelha de coelho 1:50 (1,5mg/mL) a 37°C por 20 minutos. As células SRBC sensibilizadas foram diluídas para 2x10^8 células/mL em GVB++ antes do uso no ensaio de hemólise. O soro humano normal ou soro de macaco cynomolgus foi diluído para 2% ou 10% em tampão GVB++. Para testar a inibição da atividade de hemólise mediada por C5, os anticorpos teste foram pré-incubados durante 20 minutos a 4°C, em concentrações variando de 0,6 nM a 800 nM em soro humano normal a 2% -10% ou soro de macaco cynomolgus a 10% ou soro de macaco *African green*. Placas de 96 cavidades de fundo redondo foram usadas para medir a atividade da hemólise. Um total de 100ul de RBCs de ovelha sensibilizados (2x10^células/mL) foi semeado em uma placa de 96 cavidades seguindo-se a adição de 100 ul de amostras de soro respectivas que foram pré-incubadas com os anticorpos teste. As células foram gentilmente misturadas e incubadas a 37°C por 60 minutos. Após o tempo de incubação, as células foram giradas por centrifugação a 1250xg a 4°C. Um total de 100 uL do sobrenadante foi transferido para uma placa de fundo plano 96 fresca e lida em 412 nm no leitor de microplaca Spectramax. A atividade hemolítica foi calculada na concentração sérica final de 1-5% para tratamentos.

[0268] O percentual de hemólise foi calculado como segue:

$$\% \text{ de Hemólise} = 100 \times \frac{\text{(Lise Celular Experimental – Lise Celular de Base)}}{\text{(Lise Celular Máxima – Lise Celular de Base)}}$$

[0269] Nesta equação, "lise celular de base" é a OD em A412nm das células incubadas em tampão GVB++ apenas não contendo soro. A "lise celular máxima" é a OD em A412nm das células tratadas com água. Os resultados, expressos como% de hemólise foram analisados usando regressão não linear (logísticas de 4 parâmetros) com o software Prism 5 (GraphPad) para obter os valores de IC_{50}. Dados representados como média ± erro padrão da média

(B) Ensaio complementar alternativo

[0270] O número desejado de glóbulos vermelhos de coelho (RbRBCs) foi lavado em tampão GVB-Mg^{2+}/EGTA e novamente suspenso em 2x10^8células/mL. O soro de macaco cynomolgus ou de humano normal foi diluído para 10% em tampão GVB-Mg^{2+}/EGTA. Para testar a inibição da atividade da hemólise mediada por C5, anticorpos em concentrações variando de 3 nM a 800 nM foram pré-incubados durante 20 minutos a 4°C em 5-10% de soro humano normal ou soro de macaco cynomolgus. Placas de 96 cavidades de fundo redondo foram usadas para medir a atividade da hemólise. Um total de 100ul de RbRBCs (2x10^8 células/mL) foi semeado em placa de 96 cavidades seguida pela adição de 100 µl de 10% de soro humano normal ou soro de macaco cynomolgus ou soro de macaco *African green* que foi pré-incubado com os anticorpos anti-C5. As células foram gentilmente misturadas e incubadas a 37°C por 60 minutos. Após o tempo de incubação, as células foram giradas por centrifugação em 1250xg a 4°C. Um total de 100 µL do sobrenadante foi transferido para uma placa de fundo plano 96 fresca e lida em 412 nm na leitora de microplaca Spectramax. A atividade hemolítica foi calculada na concentração sérica final de 5% de soro.

[0271] O percentual de hemólise foi calculado como segue:

% de Hemólise = 100 × (Lise Celular Experimental – Lise Celular de Base)

(Lise Celular Máxima – Lise Celular de Base)

[0272] Nesta equação, "lise celular de base" é a OD em A412nm das células incubadas em tampão GVB-Mg/EGTA apenas não contendo soro ou sem qualquer anticorpo anti-C5. A "lise celular máxima" é a OD em A412nm das células tratadas com água. Inibição por anticorpos anti-C5, os valores de IC_{50} foram calculados usando regressão não linear (logísticas de 4 parâmetros) com o software Prism 6 (GraphPad).

Resultados

(A) Inibição da Hemólise de C5 Humana

[0273] Um total de 25 anticorpos de C5 anti-humanos (hC5), 16 não mutados e 9 mutados, foram testados quanto à sua capacidade de inibir o C5 do soro humano normal (NHS) no ensaio de CH50 usando glóbulos vermelhos de ovelha sensibilizados (SRBCs) e ensaio AH50 usando glóbulos vermelhos de coelho (RRBCs).

Tabela 19: Inibição de anticorpo anti-hC5 da atividade de CP e AP em soro humano normal a 1% ou 5% (NHS)

PID de mAb	CP Humano	AP Humano	CP Humano	AP Humano
	IC_{50} [M]	IC_{50} [M]	% de Inibição Máx.	% de Inibição Máx.
H4H12183P2	5,88E-09	1,60E-07	99,9%	78,9%
H4H12176P2	4,58E-09	1,65E-08	94,1%	69,9%
H4H12168P	3,33E-09	2,85E-08	97,5%	66,2%
H4H11686N	3,09E-09	1,30E-08	97,4%	76,2%
H4H12167P	3,68E-09	1,55E-08	99,9%	64,8%
H4H12161P	2,56E-09	2,55E-08	93,7%	56,1%
H4H12163P	2,72E-09	2,05E-08	96,1%	66,0%
H4H12166P	2,80E-09	2,60E-08	95,0%	70,9%
H4H11683N	2,54E-09	3,40E-08	98,1%	73,2%
H4H12159P	2,50E-09	1,75E-08	97,9%	73,4%
H4H12177P2	2,34E-09	1,70E-08	97,5%	71,0%
H4H12170P	2,39E-09	1,80E-08	98,2%	81,1%
H4H12175P	2,36E-09	2,00E-08	98,0%	80,2%
H4H12171P	2,33E-09	1,55E-08	94,9%	42,0%
H4H12164P	2,10E-09	1,45E-08	95,9%	69,7%
H4H12169P	2,36E-09	2,00E-08	98,3%	44,5%
Controle de isótipo	Nenhuma atividade	Nenhuma atividade	Nenhuma atividade	Nenhuma atividade

[0274] Como mostrado na Tabela 19, dezesseis anticorpos anti-hC5 desta invenção mostraram mais de 94% de inibição de hemólise na trilha clássica (CP) mediada por C5 presente em 1% do soro humano. As IC50s de anticorpos variaram de 2,1 a 5,9 nM e o percentual de inibição variou de 95% - 99%. Todos os 16 anticorpos anti-C5

mostraram mais de 60% de inibição (exceto H4H12169P) no ensaio de hemólise da trilha alternativa (AP) mediado por C5 presente em NHS a 5%. As IC50s de anticorpos variaram de 13 a 160 nM e a atividade de percentual de inibição variou de 44% a 81%.

Tabela 20: Inibição do anticorpo anti-hC5 da atividade de CP e AP em soro humano normal a 5% (NHS)

PID de mAb	CP Humano	AP Humano	CP Humano	AP Humano
	IC_{50} [M]	IC_{50} [M]	% de Inibição Máx,	% de Inibição Máx,
H4H12166P	1,09E-08	2,09E-08	99,4%	86,9%
H4H12166P2	1,59E-08	4,78E-08	98,2%	81,3%
H4H12166P3	1,34E-08	6,00E-08	95,9%	78,3%
H4H12166P4	1,32E-08	3,17E-08	98,6%	77,0%
H4H12166P5	1,49E-08	6,55E-08	97,1%	77,7%
H4H12166P6	1,03E-08	2,84E-08	98,1%	82,4%
H4H12166P7	2,43E-08	1,56E-07	93,7%	83,2%
H4H12166P8	1,41E-08	7,30E-08	95,7%	73,3%
H4H12166P9	1,16E-08	5,35E-08	93,7%	72,2%
H4H12166P10	4,44E-08	Nenhuma atividade	74,0%	Nenhuma atividade
Controle de isótipo	Nenhuma atividade	Nenhuma atividade	Nenhuma atividade	Nenhuma atividade

[0275] Como mostrado na Tabela 20, todos os 9 anticorpos anti-hC5 mutados mostraram inibição da atividade de hemólise de CP e AP mediada por C5 presente em 5% do soro humano. No ensaio de hemólise de CP, o anticorpo parental, não mutado H4H12166P mostrou mais de 98% de inibição com IC50 de 10,9 nM. Oito anticorpos anti-hC5 mutados mostraram mais de 90% de inibição com IC50 variando de 10,3 nM a 24,3 nM. O anticorpo mutante anti-C5 12166P10 mostrou inibição parcial de 74%. No ensaio de hemólise de AP, o anticorpo parental, não mutado H4H12166P mostrou mais de 85% de inibição com IC50s de 20,9 nM. Os anticorpos anti-hC5 mutados mostraram uma faixa de inibição de 72-83% e os anticorpos de IC50s variaram de 28 nM a 0,15 µM.

(B) Inibição da hemólise de C5 de macaco

[0276] Um total de 25 anticorpos de C5 anti-humano (hC5), 16 não mutados e 9 mutados, foram testados quanto à sua capacidade de inibir

C5 de macaco Cynomolgus e macaco *African green* no ensaio de CH50 usando glóbulos vermelhos de ovelha sensibilizado (SRBCs) e ensaio AH50 usando glóbulos vermelhos de coelho (RRBCs).

Tabela 21: Inibição de anticorpo anti-hC5 da atividade de CP e AP em 5% de soro de macaco *African green* (AGM) normal

	CP de Soro de AGM	AP de Soro de AGM	CP de AGM	AP de AGM
PID de mAb	**IC_{50} [M]**	**IC_{50} [M]**	**% de Inibição Máx,**	**% de Inibição Máx,**
H4H12183P2	Nenhuma atividade	Nenhuma atividade	Nenhuma atividade	Nenhuma atividade
H4H12176P2	3,04E-08	4,77E-08	91,0%	83,2%
H4H12168P	2,80E-08	2,25E-08	90,8%	88,2%
H4H11686N	4,82E-08	1,63E-07	49,3%	50,4%
H4H12167P	6,95E-08	6,95E-08	90,5%	53,4%
H4H12161P	3,19E-08	4,75E-08	78,9%	35,7%
H4H12163P	6,90E-08	2,16E-07	83,2%	58,5%
H4H12166P	1,30E-07	2,33E-07	81,0%	44,2%
H4H11683N	2,92E-08	4,08E-08	81,1%	88,1%
H4H12159P	2,58E-08	2,70E-08	93,4%	93,5%
H4H12177P2	1,80E-07	1,01E-07	80,6%	8,80%
H4H12170P	2,54E-08	2,69E-08	94,9%	90,9%
H4H12175P	1,18E-07	9,85E-08	84,5%	17,4%
H4H12171P	Nenhuma atividade	2,33E-08	17,8%	69,70%
H4H12164P	2,47E-07	1,78E-07	85,8%	15,60%
H4H12169P	3,44E-08	9,15E-08	43,3%	45,70%

[0277] Como mostrado na Tabela 21, os anticorpos anti-hC5 mostraram diferentes níveis de inibição da atividade de hemólise de CP ou AP em 5% de soro de macaco *African green*. No ensaio de CP, dois dos 16 anticorpos anti-hC5 não mostraram inibição da atividade de hemólise. Quatorze anticorpos mostraram inibição variando de 43-94%, com IC50s variando de 25 nM a 180 nM. No ensaio de hemólise de AP, treze dos 17 anticorpos mostraram atividade de inibição variando de 17% - 93% com IC50s variando de 22,5 nM a 233 nM.

Tabela 22: Inibição de anticorpo anti-hC5 da atividade de CP e AP em soro de macaco Cynomolgus (Cyno) normal a 5%

	CP de Sero de Cyno	AP de Sero de Cyno	CP de Cyno	AP de Cyno
PID de mAb	**IC_{50} [M]**	**IC_{50} [M]**	**% de Inibição Máx,**	**% de Inibição Máx,**
H4H12183P2	1,42E-07	2,96E-08	64,6%	100,0%
H4H12171P	8,70E-09	7,20E-09	92,9%	98,8%
H4H12170P	8,20E-09	7,00E-09	99,0%	99,2%
H4H12159P	7,75E-09	7,05E-09	99,3%	99,6%
H4H12168P	1,03E-08	5,45E-09	99,0%	99,7%
H4H11683N	9,00E-09	7,15E-09	98,8%	98,9%
H4H12176P2	1,47E-08	7,70E-09	97,5%	99,3%
H4H12161P	2,79E-08	7,80E-09	100,0%	98,4%
H4H12169P	1,99E-08	7,95E-09	92,8%	96,30%
H4H11686N	1,41E-08	9,00E-09	94,5%	98,7%
H4H12163P	1,65E-08	1,02E-08	96,4%	98,5%
H4H12167P	2,13E-08	7,60E-09	100,0%	98,30%
H4H12175P	1,09E-08	8,05E-09	96,7%	98,10%
H4H12166P	2,01E-08	8,85E-09	94,2%	98,60%
H4H12177P2	1,71E-08	8,80E-09	94,90%	98,10%

H4H12164P	1,96E-08	9,10E-09	94,7%	98,70%
Controle de isótipo	Nenhuma atividade	Nenhuma atividade	Nenhuma atividade	Nenhuma atividade

[0278] Como mostrado na Tabela 22, os anticorpos anti-hC5 (exceto H4H12183P2, que mostrou 64% de inibição de CP) mostraram mais de 90% de inibição de ensaio de hemólise de CP ou AP em 5% do soro de macaco Cynomolgus. No ensaio de hemólise de CP, as IC50s de anticorpos variaram de 7,15 nM a 142 nM. No ensaio de hemólise de AP, as IC50s de anticorpos variaram de 5,4 a 29,6 nM.

(C) Inibição da hemólise de C5 humana variante

[0279] Os anticorpos anti-C5 selecionados foram testados quanto à sua capacidade de inibir o C5 humano variante (veja, aqui o Exemplo 3) do soro humano esgotado de C5 no ensaio de CH50. No soro humano esgotado de C5 suplementado com a variante de C5 exógena R885H, H4H12166P, e o Comparador 2 bloquearam a hemólise CP com valores de IC50 de 6,0nM e 4,4nM, respectivamente, e valores de IC80 de 7,6nM e 5,5nM, respectivamente. Para a variante R885C, H4H12166P e Comparador 2 bloquearam a hemólise de CP em soro humano esgotado de C5 com variantes de C5 exógenas com uma IC50 de 9,3 nM e 6,8 nM, respectivamente, e valores IC80 de 11 nM e 8,2 nM, respetivamente. Como esperado, o Comparador 1 não bloqueou a atividade hemolítica das variantes de C5 humanas.

(D) Inibição do complexo de C5b-6 humano

[0280] Os anticorpos anti-C5 selecionados foram testados quanto à sua capacidade de inibir o complexo C5b-6 humano do soro humano esgotado de C5 no ensaio de CH50. H4H12166P bloqueou potencialmente a hemólise da CP em soro humano esgotado de C5 suplementado com complexo huC5b-6 exógeno com uma IC50 de 3,8 nM e valor de IC80 de 5,8 nM. Em contraste, o Comparador 1 bloqueou a hemólise mediada pelo complexo C5b-6 com menor potência, com valores de IC_{50} de 5,0 nM e valor de IC80 de 46 nM, respectivamente. O comparador 1 inibiu apenas 70% da hemólise total nas concentrações

mais elevadas testadas. O comparador 2 não bloqueou a atividade hemolítica do complexo C5b-6 humano.

Exemplo 9: Anticorpos anti-C5 bloqueiam a geração de C5a no ensaio de hemólise de CP

[0281] Para avaliar se os anticorpos anti-C5 inibem a geração de C5a, os sobrenadantes do ensaio para hemólise da trilha clássica (CP) foram analisados para os níveis de C5a por ELISA.

[0282] O C5a, gerado como o resultado da clivagem de C5, é um fragmento proteico de 74 aminoácidos. O C5a é rapidamente metabolizado pelas carboxipeptidases de soro para uma forma mais estável, menos ativa, de 73 aminoácidos, C5a des-Arg, por remoção da arginina C-terminal. A quantificação de C5a des-Arg, portanto, fornece uma medição confiável para monitorar a geração de C5a *in vivo* e *in vitro*. O kit de ELISA MicroVue C5a usado aqui detecta C5a des-Arg de acordo com informações fornecidas pelo fabricante. Experiências preliminares (dados não mostrados) indicam que a forma primária de 74 aminoácidos de C5a também é detectada. Para o propósito deste exemplo, ambas as formas serão referidas coletivamente como "C5a".

[0283] Os níveis de proteína C5a foram determinados em sobrenadantes do ensaio de hemólise de CP usando soro humano normal (NHS) pré-incubado com complemento pré-incubado com H4H12166P ou anticorpo de controle de isótipo como descrito no Exemplo 8. Os níveis de proteína C5a foram medidos usando o kit de ELISA MicroVue C5a de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras foram diluídas e incubadas em placas pré-revestidas com anticorpo de captura (anti-C5a de camundongo específico para um neo-epítopo em C5a humano). A proteína C5a humana fornecida pelo fabricante foi usada como padrão para calibração. C5a nos sobrenadantes foi detectado por anticorpo de detecção conjugado com HRP (anticorpo monoclonal de camundongo

para a região C5a de C5). O substrato de HRP cromogênico, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), foi adicionado para detectar a atividade de HRP. Utilizou-se uma solução de ácido clorídrico a 1N para interromper a reação e mediu-se a densidade ótica a 450 nm (OD450) em uma leitora de placa SpectraMax. Os dados foram analisados usando regressão não linear (logísticas de 4 parâmetros) no GraphPad Prism. A concentração de C5a foi expressa como ng/mL de sobrenadante.

[0284] No ensaio usando NHS a 5%, H4H12166P bloqueou potencialmente os aumentos em níveis de proteína C5a de uma maneira dependente da dose com uma IC50 de 8,5nM, enquanto o anticorpo de controle do isótipo não teve efeito nos níveis de C5a (Figura 1). O bloqueio máximo na concentração de H4H12166P testada mais alta (267nM) resultou em um decréscimo de ~ 10 vezes nos níveis de C5a para 3,8 ng/mL (0,3nM), em comparação com 34 ng/mL (2,8nM) observado na menor concentração de H4H12166P testada (1 nM) em soro a 5%. A concentração de C5a observada para o bloqueio máximo foi próxima do nível de C5a de linha de base de 2,3 ng/mL (0,2 nM) em NHS não tratado a 5%.

Exemplo 10: Caracterização das farmacocinéticas e farmacodinâmicas de anticorpos anti-C5 em macaco cynomolgus

[0285] Este Exemplo descreve a caracterização das farmacocinéticas (PK) e farmacodinâmicas (PD) de anticorpos anti-C5 selecionados conduzidos em macacos cynomolgus machos. Os níveis de C5 endógenos foram determinados antes da dosagem do anticorpo anti-C5 e usados para estratificar os grupos de dose animal.

[0286] Níveis de C5 circulantes totais em macacos cynomolgus foram determinados usando um ELISA de C5 Complementar Humano (Abcam, cat # ab125963), que foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. Concentrações médias de proteína C5 em macacos foram determinadas em 90,85 µg/mL ± 19,17 µg/mL.

[0287] Para cada anticorpo anti-C5, 4 macacos cynomolgus receberam, cada qual, uma única injeção intravenosa (IV) em uma dose de 15 mg/kg. Amostras de sangue foram coletadas de cada animal da pré-dose até 1680 horas (70 dias), processadas em soro e congeladas a -80°C até serem analisadas para PK e PD.

Análise do Nível de Anticorpo de IgG Total por Imunoensaio de ELISA

[0288] As concentrações de anticorpo totais nas amostras de soro de macaco foram medidas usando um ELISA direto não validado. O procedimento de ELISA empregou utilizou uma placa de microtítulo revestida com um anticorpo monoclonal de IgG1/IgG1 Fc anti-humano de camundongo. Diferentes anticorpos anti-C5 foram adicionados à placa e os anticorpos anti-C5 capturados na placa foram detectados usando um anticorpo monoclonal de IgG4 Fc anti-humano de camundongo biotinilado, seguido por NeutrAvidin conjugado com Peroxidase de Rábano Silvestre (NeutrAvidin HRP). Um substrato baseado em luminol específico para peroxidase foi, então, adicionado para alcançar uma intensidade de sinal que é proporcional à concentração do anticorpo anti-C5 capturado total. As medidas da unidade de luz relativa (RLU) dos padrões de calibração e suas respectivas concentrações nominais foram ajustadas usando uma equação Logística de 4 Parâmetros ponderada para gerar uma equação de calibração que descreveu a concentração de anticorpos anti-C5 e a relação de resposta do ensaio. O limite inferior de quantificação (LLOQ) foi de 1,56 ng/mL no ensaio (2% de soro de macaco) e 78 ng/mL em soro de macaco puro.

Determinação dos parâmetros PK

[0289] Os parâmetros PK foram determinados por análise não compartimental (NCA) usando o software Phoenix®WinNonlin® (Versão 6.4, Certara, L.P.) e um modelo de dosagem de bolo IV.

[0290] Todos os parâmetros PK foram derivados dos respectivos valores de concentração médios, incluindo a concentração máxima observada no soro ($C_{máx}$), o tempo de concentração de pico observado, $t_{máx}$ e a meia-vida estimada observada ($T_{1/2}$). Para cada anticorpo, a área sob a concentração versus curva de tempo até a última concentração mensurável ($AUC_{última}$) e extrapolada do tempo zero ao infinito (AUC_{inf}) foi determinada usando uma regra trapezoidal linear com interpolação linear e ponderação uniforme.

Análise PD por Ensaio de Hemólise *ex vivo*

[0291] As farmacodinâmicas de anticorpos anti-C5 selecionados foram analisadas usando ensaios de hemólise de trilha clássica e trilha alternativa *ex vivo*.

[0292] Ensaio de Hemólise de Trilha Clássica: Os glóbulos vermelhos de ovelha (SRBCs) foram lavados em tampão GVB++ (Tampão Gelatin Veronal com CaCl2 e MgCl2) (Boston BioProducts) e ressuspensos em 1x10^9 células/mL. Para sensibilizar os SRBCs, um total de 1x10^9/mL de SRBCs foi misturado com volume igual da hemolisina anti-ovelha de coelho diluída 1:50 (1,5 mg/mL) a 37°C por 20 minutos. Os SRBCs sensibilizados foram diluídos em 2x10^8 células/mL em tampão GVB++ antes de usar no ensaio de hemólise. O sangue de macacos Cynomolgus foi recolhido antes da dosagem e aos 5 minutos, 4 e 8 horas, e 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 18, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 dias após a dose para análise PD. O soro foi preparado e congelado até uso posterior. No dia do ensaio, o soro de cynomolgus a partir dos respectivos pontos de tempo foi diluído para 10% em tampão GVB++. Placas de 96 cavidades de fundo redondo foram usadas para medir a atividade da hemólise. Um total de 100µl de SRBCs sensibilizados (2x10^8 células/mL) foram semeados em placa de 96 cavidades a 37°C seguido pela adição de 100µL de soro de macaco cynomolgus a 10% dos respectivos pontos de tempo. Os SRBCs foram

gentilmente misturados e incubados a 37°C por 10 minutos. Após o tempo de incubação, as células foram centrifugadas em 1250xg a 4°C. Um total de 100µL do sobrenadante foi transferido para uma placa de fundo plano 96 fresca e lida em 412nm em uma leitora de microplaca Spectramax. A atividade hemolítica foi calculada na concentração sérica final de 5%. A porcentagem de hemólise foi calculada com os valores de absorvência usando a seguinte equação:

$$\% \text{ de Hemólise} = 100 \times \frac{\text{(Lise Celular Experimental – Lise Celular de Base)}}{\text{(Lise Celular Máxima – Lise Celular de Base)}}$$

[0293] Nesta equação, "lise celular de base" é a OD em A412nm dos SRBCs incubados em tampão GVB++ apenas não contendo soro. A "lise celular máxima" é a OD em A412nm de SRBCs tratados com água. Os resultados, expressos em% de hemólise, foram analisados usando regressão não linear (logísticaa de 4 parâmetros) com o software Prism 5 (GraphPad) para obter os valores de IC_{50}. Os dados são representados como média ± Erro Padrão da Média.

[0294] Ensaio de Hemólise de Trilha Alternativa: O número desejado de glóbulos vermelhos de coelho (RbRBCs) foi lavado em tampão GVB-Mg^{2+}/EGTA e novamente suspenso em 2x10^8 células/mL. O sangue de macacos Cynomolgus foi colhido antes da dosagem e aos 5 minutos, 4 e 8 horas, e 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 18, 21, 28, 35, 42 e 49 dias após a dose para análise PD. O soro foi preparado e congelado até uso posterior. Placas de 96 cavidades de fundo redondo foram usadas para medir a atividade da hemólise. Um total de 100µl de RbRBCs (2x10^8 células/mL) foi semeado em placa de 96 cavidades a 37°C, seguido pela adição de 100µl de soro de macaco cynomolgus a 10% dos respectivos pontos de tempo listados acima. Os RbRBCs foram gentilmente misturados e incubados a 37°C por 60 minutos. Após o tempo de incubação, as células foram centrifugadas em 1250xg a 4°C. Um total de 100µL do sobrenadante foi transferido para uma placa de fundo plano 96 fresca que foi lida em 412nm em uma leitora de

microplaca Spectramax. A atividade hemolítica foi calculada para concentração sérica final de 5% e expressa como porcentagem da hemólise total de RBCs pela água. A porcentagem de hemólise foi calculada como descrito acima.

Resultados

[0295] Os anticorpos anti-C5 selecionados (listados na Tabela 1) foram testados em experiências iniciais para perfis farmacocinéticos prolongados em macacos Cynomolgus e em camundongos C5-humanizados (descritos no Exemplo 10). H4H12166P e H4H12161P foram selecionados como tendo elevada afinidade juntamente com PK prolongada e usados em experiências subsequentes com o Comparador 1 e o Comparador 2.

[0296] Os macacos Cynomolgus receberam uma única dose de bolo IV de 15 mg/kg de H4H12166P, H4H12161P, ou Comparador 2. As concentrações séricas de anticorpo total e o percentual da atividade da hemólise da trilha clássica (PC) foram determinadas em 19 pontos de tempo durante um período de 70 dias no período de vida. A hemólise da trilha alternativa (AP) foi determinada em 17 pontos no tempo, durante um período de vida de 50 dias. A Tabela 23 resume as concentrações médias de anticorpo para todos os 3 anticorpos. As concentrações de anticorpo total médias versus perfis de tempo são mostradas na Figura 2. Os parâmetros PK médios são descritos na Tabela 24.

Tabela 23: Concentrações Médias de IgG Total no Soro Após uma Única Injeção Intravenosa de 15 mg/kg de Anticorpos Anti-C5 Selecionados para Macacos Cynomolgus Machos

Tempo (horas após dose)	#	Concentração sérica de Ab (µg/mL) Média ±SD		
		H4H12166P	H4H12161P	Comparador 2
0	4	BLQ	BLQ	BLQ
0,083	4	445 ±30	456 ±26,2	459 ±55,2
4	4	328 ±27	360 ±28,2	363 ±43,8
8	4	353 ±29,9	316 ±21,5	357 ±16,1
24	4	282 ±43,6	276 ±32,4	248 ±19,6
48	4	225 ±15,2	221 ±21,5	212 ±19,3
72	4	180 ±15,0	181 ±17,2	196 ±36,2

120	4	194 ±20,9	162 ±10,7	179 ±23,3
168	4	171 ±29,9	132 ±17,0	157 ±18,4
240	4	157 ±12,7	96,1 ±17,3	114 ±13,0
336	4	120 ±10,2	49,3 ±18,7	67,9 ±25,8
432	4	105 ±13,9	24,6 ±11,8	42,6 ±15,9
504	4	92,2 ±10,6	13,8 ±9,95	28,6 ±13,1
672	4	75,1 ±15,8	6,16 ±2,40	10,9 ±6,25
840	3	59,6 ±4,79	2,44 ±0,85	4,45 ±2,63
1008	3	43,3 ±2,89	1,16 ±0,52	2,17 ±1,58
1176	3	30,6 ±1,42	0,57 ±0,25	1,29 ±1,16
1344	3	25,9 ±3,74	0,315 ±0,16	0,492 ±0,49
1512	3	18,2 ±2,41	0,17 ±0,08	0,270 ±0,27
1680	3	11,5 ±1,51	0,079±0,07	0,123 ±0,15

Tempo = tempo em horas após a injeção de dose única;

SD = desvio padrão; BLQ = Limite Abaixo de Quantificação

[0297] Após administração de bolo intravenosa IV, os perfis de concentração-tempo de IgG total de H4H12166P, H4H12161P e Comparador 2 foram caracterizados por uma fase de distribuição breve inicial seguida por fases de eliminação únicas ao longo do período de vida. As concentrações de H4H12166P, H4H12161P e Comparador 2 de pico foram altamente comparáveis, pois os valores de $C_{máx}$/Dose correspondentes entre todos os anticorpos estavam dentro de 1,1 vezes (29,7, 30,4 e 30,6 [(ug/mL)/(mg/kg)], respectivamente) (Tabela 24).

Tabela 24: Parâmetros Farmacocinéticos Médios das Concentrações de IgG Totais no Soro Após uma Única Injeção Intravenosa de 15 mg/kg de Anticorpos Anti-C5 Selecionados em Macacos Cynomolgus Machos

Parâmetro	**H4H12166P**		**H4H12161P**		**Comparador 2**	
	15 mg/kg IV (n = 4)					
	Média	**SD**	**Média**	**SD**	**Média**	**SD**
$C_{máx}$ (µg/mL)	445	30,0	456	26,2	459	55,2
$C_{máx}$/Dose (µg/mL)/(mg/kg)	29,7	2,00	30,4	1,75	30,6	3,68
C_0 (µg/mL)	448	30,5	458	26,6	461	55,6
$t_{máx}$ (hours)	0,083	0	0,083	0	0,083	0
$AUC_{última}$ dia•(µg/mL)	5080	1040	2350	357	2810	470
$AUC_{última}$/Dose dia• (µg/mL)/(mg/kg)	339	69,3	157	23,8	187	31,3
AUC_{inf} dia•(µg/mL)	5550	671	2350	356	2810	470
AUC_{inf}/Dose dia• (µg/mL)/(mg/kg)	370	44,7	157	23,7	188	31,4
CL (mL/h/kg)	0,114	0,0143	0,270	0,0411	0,228	0,0425
V_{ss} (mL/kg)	60,4	4,85	44,0	4,34	45,3	3,06
$t_{1/2}$ (dia)	15,6	1,43	5,50	2,45	5,91	1,13

IV = Intravenosa; n = Número de animais; $C_{máx}$ = Concentração de pico; C0 = Concentração inicial determinada por extrapolação; $t_{máx}$ = Tempo para $C_{máx}$; AUC = Área sob a curva de concentração-tempo; $AUC_{última}$ =

AUC calculada a partir do tempo zero até ao momento da última concentração positiva; AUC_{inf} = AUC do tempo zero extrapolada para o infinito; CL = *Clearance* de corpo total; V_{ss} = Volume de distribuição em estado estacionário; $t_{1/2}$ = Meia-vida; SD = Desvio Padrão.

Nota: $t_{máx}$ é expresso em horas nominais

[0298] A avaliação dos perfis de concentração-tempo revelou que o H4H12166P demonstrou a eliminação mais lenta com concentrações de anticorpo terminal ≥ 10 µg/mL até o dia 71 do estudo. As cinéticas de H4H12161P e do Comparador 2 foram semelhantes; ambos demonstraram uma eliminação mais rápida do que o H4H12166P, com concentrações de mAb ≥ 10 µg/mL ao dia 22 e 29, respectivamente.

[0299] Consequentemente, as exposições normalizadas à dose ($AUC_{última}$/dose) indicaram que o H4H12166P teve a maior exposição no 339 dias* (µg/mL)/(mg/kg), enquanto o H4H12161P e o Comparador 2 tiveram uma exposição aproximadamente 2 vezes menor, 157 e 187 dias* (µg/mL)/(mg/kg), respectivamente, do que a de H4H12166P.

[0300] A meia-vida do anticorpo ($t_{1/2}$) calculada durante a fase de eliminação variou de 5,5 a 15,6 dias entre os grupos de dose e também correlacionada com a exposição, uma vez que H4H12166P teve o $t_{1/2}$ correspondentemente mais elevado de 15,6 dias, enquanto H4H12161P e Comparador 2 tiveram valores de $t_{1/2}$ de 5,5 e 5,9 dias, respectivamente.

[0301] Os efeitos farmacológicos dos anticorpos anti-C5 de amostras de soro de macaco cynomolgus foram determinados *ex vivo* por hemólise de trilha clássica (PC) complementar de glóbulos vermelhos de ovelha sensibilizados (SRBCs) e hemólise da trilha alternativa (AP) de glóbulos vermelhos de coelho (RbRBCs). A inibição da atividade hemolítica foi calculada para uma concentração sérica final de 5% e expressa como porcentagem da hemólise total de RBCs pela água. A Tabela 25 resume a atividade *ex vivo* dos 3 anticorpos,

conforme determinado pela percentagem de hemólise média.

Tabela 25: Percentual da Atividade de Hemólise da Trilha Alternativa e Clássica *Ex Vivo* de Anticorpos anti-C5 Selecionados

Tempo (horas após dose)	#	% de Hemólise da Trilha Clássica em soro de cynomolgus, 10 min, Média ±SEM			% de Hemólise da Trilha Alternativa em soro de cynomolgus, 60 min, Média ±SEM		
		H4H12166P	H4H12161P	Comparador 2	H4H12166P	H4H12161P	Comparador 2
0	4	91,34 ±7,6	Não testado	84,36 ±20,28	73,44 ±17,26	64,90 ±19,51	55,77 ±10,82
0,083	4	3,5 ±1,4	Não testado	6,6 ±6,5	5,53 ±1,98	5,90 ±3,92	3,83 ±3,93
4	4	2,35 ±1,06	Não testado	3,16 ±2,2	7,43 ±2,54	6,53 ±2,7	5,30 ±2,80
8	4	1,55 ±0,21	Não testado	1,25 ±0,21	3,53 ±0,91	4,70 ±2,77	1,98 ±0,83
24	4	7,7 ±6,08	Não testado	4,55 ±2,05	13,40 ±2,77	4,68 ±1,89	4,65 ±2,35
48	4	2,85 ±2,19	Não testado	2,6 ±0,7	5,53 ±2,40	7,68 ±5,22	2,28 ±0,67
72	4	0,9 ±0,42	Não testado	1,3 ±0,28	7,95 ±3,36	5,95 ±2,23	1,45 ±0,33
120	4	1,75 ±0,07	Não testado	1,3 ±0,14	16,38 ±6,91	7,60 ±1,94	1,68 ±0,22
168	4	1,6 ±1,13	Não testado	1,4 ±0,56	21,28 ±8,24	10,75 ±2,27	2,15 ±0,19
240	4	1 ±0,14	Não testado	3,7 ±2,83	19,18 ±10,20	13,53 ±7,17	14,20 ±16,73
336	4	2,55 ±2,05	Não testado	37,85 ±5,3	21,10 ±7,55	50,58 ±12,91	65,60 ±26,04
432	4	1,35 ±0,91	Não testado	105,25 ±3,3	15,20 ±10,86	59,75 ±12,65	54,55 ±19,11
504	4	3,55 ±2,05	Não testado	107,1 ±4,38	33,15 ±8,80	88,55 ±24,63	85,63 ±27,48
672	4	2,2 ±0,56	Não testado	88,9 ±23,05	75,25 ±18,30	88,55 ±8,53	91,58 ±18,55
840	3	3,075 ±2,70	Não testado	105,37 ±53,4	46,65 ±5,30	92,33 ±5,16	91,85 ±2,33
1008	3	15,5 ±26,6	Não testado	108,85 ±2,35	58,60 ±9,48	92,45 ±6,27	92,30 ±2,69
1176	3	58,33 ±39,55	Não testado	113,85 ±2,62	72,95 ±5,87	104,90 ±3,5	101,90 ±0,42
1344	3	71,55 ±43,02	Não testado	110,3±1,98	Não testado	Não testado	Não testado
1512	3	91,375 ±29,7	Não testado	110,6±0,85	Não testado	Não testado	Não testado
1680	3	112,22 ±4,06	Não testado	112,15±0,5	Não testado	Não testado	Não testado

Tempo = tempo em horas após a injeção de dose única; SEM = erro padrão da média; BLQ = Limite Abaixo de Quantificação; NC = Não calculado

[0302] Como mostrado na Tabela 25 e Figura 2, os efeitos da PD foram medidos pelo CP complementar (10 minutos de incubação) até o Dia 70. H4H12166P bloqueou mais de 95% da atividade hemolítica da CP até o dia 35. A atividade retornou aos níveis de hemólise máxima de pré-estudo no dia 70. O comparador 2 bloqueou cerca de 95% da atividade hemolítica da CP até o dia 10, e a atividade rapidamente retornou aos níveis de hemólise máximos de pré-estudo no dia 18.

[0303] Os efeitos da PD também página foram medidos por meio de ensaios de hemólise da trilha de AP complementar (60 minutos de incubação) até o dia 49. Como mostrado na Tabela 25 e Figura 3, H4H12166P bloqueou 80% da atividade hemolítica de AP total até o dia 18 e a atividade retornou ao nível de hemólise máxima de pré-estudo

no dia 50. O H4H1216P e o Comparador 2 bloquearam 90% da atividade hemolítica de AP até o dia 7, e a atividade voltou aos níveis de hemólise máxima de pré-estudo no 21º dia.

Exemplo 11: Caracterização de PK/PD de anticorpos anti-C5 em camundongos C5-humanizados

[0304] Neste conjunto de experiências, as farmacocinéticas e farmacodinâmicas de anticorpos anti-C5 selecionados foram avaliadas em camundongos humanizados para expressar a proteína C5 humana usando tecnologia de Velocigene® (Valenzuela *et al*., 2003, Nat. Biotechnol. 21: 652-659). Os camundongos humanizados foram construídos para substituir o éxon 2 ao éxon 41 do gene C5 de murino com os éxons 2 - 42 do gene C5 humano (descrito na Publicação do Pedido de Patente US 2015/0313194, aqui incorporado em sua totalidade).

[0305] Os níveis de C5 humanos circulantes totais foram determinados usando um ELISA Human Complement C5 (Abcam, cat # ab125963), que foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

Determinação do Nível de Fármaco Total em Soro por ELISA

[0306] As concentrações de anticorpo anti-C5 circulante, tanto ligado como não ligado a C5, foram determinadas por análise de anticorpo humano total usando ELISA. Resumidamente, um anticorpo policlonal de IgG anti-humano de cabra em 1 µg/mL em PBS foi imobilizado em placas de 96 cavidades durante a noite; as placas foram lavadas para remover IgG não ligado e depois bloqueadas com 5% de BSA. Diluições em série de anticorpo anti-C5 contendo amostras de soro (6 pontos) e os padrões de referência (12 pontos) dos respectivos anticorpos foram transferidos para as placas revestidas com IgG anti-humano e incubados durante uma hora. Os anticorpos anti-C5 ligados a placas foram, então, detectados usando um anticorpo policlonal de

IgG anti-humano de cabra conjugado com peroxidase de rábano silvestre. As placas foram desenvolvidas com substrato de TMB de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante e os sinais de densidade ótica (OD) em 450 nm foram registrados usando uma Leitora de Placas Multimodal Perkin Elmer Victor X4. As concentrações de anticorpo anti-C5 no soro foram calculadas com base na curva de calibração padrão de referência gerada usando o software GraphPad Prism.

Determinação de parâmetros PK

[0307] Os parâmetros PK foram determinados por análise não compartimental (NCA) usando o software Phoenix®WinNonlin® (Versão 6.3, Certara, L.P.) e um modelo de dosagem extravascular. Usando os respectivos valores médios de concentração para cada anticorpo, todos os parâmetros farmacocinéticos, incluindo a meia-vida estimada observada ($t_{1/2}$) e área sob a curva concentração versus tempo até a última concentração mensurável ($AUC_{última}$) foram determinados usando uma regra trapezoidal linear com interpolação linear e ponderação uniforme.

Análise PD por Ensaio de Hemólise

[0308] As farmacodinâmicas de anticorpos anti-C5 selecionados foram determinadas usando um ensaio de hemólise complementar da trilha clássica. Os glóbulos vermelhos de ovelha (SRBCs) (Sangue de ovelha em solução de Alsevers) foram lavados em tampão GVB++ (Tampão Gelatin Veronal com CaCl2 e MgCl2) (Boston BioProducts) e foram novamente suspensos em 1x10^9 células/mL. Para sensibilizar, 1x10^9/mL de SRBCs foram misturados com volume igual de hemolisina anti-ovelha de coelho diluída 1:50 (1,5 mg/mL) a 37°C por 20 minutos. Os SRBCs sensibilizados foram diluídos para 2x10^8 células/mL em GVB++ antes do uso no ensaio de hemólise. As amostras de soro de animais pré-dosados ou camundongos C5

humanizados dosados com anticorpos anti-C5 colhidos nos dias 10, 20, 30, 40 e 50 após a dose foram diluídas para 20% em tampão GVB++. Um total de 100µl de SRBCs sensibilizados (2x10^células/mL) foram semeados em placas de fundo redondo de 96 cavidades a 37°C, seguido pela adição de 100µl de soro a 20% que foi suplementado com 160-180µg/mL de proteína de complemento 3 humana (huC3). As células foram gentilmente misturadas e incubadas a 37ºC por 1 hora. Após a incubação, as células foram centrifugadas em 1250xg a 4°C. Um total de 100µL de sobrenadante foi transferido para uma placa de fundo plano 96 fresca e lida em A412nm em uma leitora de microplaca Spectramax. A porcentagem de hemólise foi calculada com os valores de absorvência usando a seguinte equação:

$$\% \text{ de Hemólise} = 100 \times \frac{\text{(Lise Celular Experimental – Lise Celular de Base)}}{\text{(Lise Celular Máxima – Lise Celular de Base)}}$$

[0309] Nesta equação, "lise celular de base" é a OD em A412nm de SRBCs incubados em tampão GVB++ apenas não contendo soro. A "lise celular máxima" é a OD em A412nm de SRBCs tratados com água. Os resultados, expressos como% de hemólise, foram analisados por meio de regressão não linear (logísticas de 4 parâmetros) com o software Prism 6 (GraphPad) para obter os valores de IC_{50}. Dados representados como Média ± (Erro Padrão da Média).

Experiência 1

[0310] Nesta experiência, as farmacocinéticas e farmacodinâmicas do anticorpo exemplar H4H12166P foram avaliadas em comparação ao Comparador 1 e o Comparador 2 em camundongos C5 humanizados. Os níveis de C5 humanos circulantes totais foram determinados usando um ELISA Human Complement C5 (Abcam, cat # ab125963), que foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. As concentrações médias de C5 humano nos ratos foram determinadas como 39,73 µg/mL ± 17,82 µg/mL. Houve uma diferença entre camundongos machos (55,4 ± 1,7 µg/mL, n = 47) e fêmeas (24,7 ± 0,6

µg/mL, n = 49).

[0311] Antes da dosagem do anticorpo, os camundongos C5 humanizados machos e fêmeas foram estratificados de acordo com os níveis de C5 humanos, com uma média de 40 µg/mL. Para cada anticorpo anti-C5, coortes de vinte e dois camundongos receberam uma dose única de 15 mg/kg de H4H12166P, Comparador 1 ou Comparador 2 por injeção subcutânea (s.c.). Todos os camundongos foram sangrados na pré-dose e em um dia após a injeção para análise PK. Além disso, aos 10, 20, 30, 40 e 50 dias após a injeção, grupos de 4 ou 5 camundongos de cada coorte foram eutanasiados e sangramentos terminais foram coletados para análise PK e PD. Amostras de soro do dia 1 foram a média de todo o coorte de 22 camundongos. O sangue foi processado em soro e congelado a -80°C até ser analisado.

[0312] As concentrações totais de anticorpo foram determinadas em 7 pontos de tempo e o percentual da atividade de hemólise foi determinada em 6 pontos de tempo ao longo do período de 50 dias de vida. As concentrações de anticorpo anti-C5 totais são resumidas na Tabela 26. As concentrações de anticorpo total médias versus o perfil de tempo são mostradas na Figura 4. Os parâmetros PK médios estão descritos na Tabela 27.

Tabela 26: Concentrações Médias de IgG Total no Soro após uma Única Injeção Subcutânea de 15 mg/kg de anticorpos anti-C5 em camundongos C5 Humanizados

Tempo (Dia)	#	Concentração sérica de Ab (µg/mL) Média±SD		
		H4H12166P	Comparador 1	Comparador 2
1	22	178±22,7	229±40,7	164±24,1
10	4	83,7±22,2	102±22,9	44±24,1
20	5	57,1±26,8	29±31,3	11,4±10,3
30	5	38,1±7,6	30,1±34,2	3,6±3,2
40	4	11,9±5,0	0,4±0,4	0,5±0,4
50	4*	9,3±12,2	0,3±0,3	0,3±0,2

Tempo = tempo em horas após a injeção de dose única; Dia = Dia de estudo; SD = Desvio padrão; SEM = Erro padrão da média; ND = Não

detectado; NS = Sem amostra. * Para o Comparador 2, dia 50, n = três devido à incapacidade de uma amostra a ser analisada devido a problemas técnicos.

Tabela 27: Parâmetros PK

Parâmetro	Unidades	H4H12166P	Comparador 1	Comparador 2
Concentração de mAb do dia 1	µg/mL	178	229	164
$AUC_{última}$	dia·µg/mL	2801	2708	1418
$t_{1/2}$	d	11,3	4,7	7,6

$C_{máx}$ = concentração máxima; AUC = Área sob a curva de concentração-tempo; $AUC_{última}$= AUC calculada do tempo zero até o tempo da última concentração positiva; $T_{1/2}$ = Meia-Vida estimada observada

[0313] Os perfis de concentração média versus tempo no dia 1 mostram que os três anticorpos, H4H12166P, Comparador 1 e Comparador 2, tinham concentrações séricas comparáveis de 178, 229 e 164 µg/mL, respectivamente. O comparador 1 tinha um perfil de eliminação semelhante ao H4H12166P até ao dia 30, mas nos dias 40 e 50 exibiu um aumento rápido na *clearance* versus H4H12166P. No dia 50, H4H12166P tinha uma concentração de soro de anticorpo média de aproximadamente 9 µg/mL, enquanto que o Comparador 1 e o Comparador 2 tinham ambos uma concentração sérica de anticorpo média de 30 vezes mais baixa de 0,3 µg/mL. O comparador 2 exibiu a menor exposição dos três anticorpos testados, com uma $AUC_{última}$ de aproximadamente 2 vezes menor (1408 dia·µg/mL) em comparação com o H4H12166P (2801 dia·µg/mL) e o Comparador 1 (2708 dia·µg/mL).

[0314] Os efeitos farmacológicos dos anticorpos anti-C5 H4H12166P, Comparador 1 e Comparador 2 de amostras de soro de camundongo C5 humanizado suplementados com C3 humano foram medidos até o dia 50 e foram determinados ex vivo por hemólise da trilha clássica complementar (CP) de SRBC sensibilizado. A porcentagem média de hemólise para cada anticorpo anti-C5 está resumida na Tabela 28 e o percentual médio de hemólise versus tempo

é mostrado na Figura 5.

Tabela 28: Percentual da Atividade de Hemólise da Trilha Clássica *Ex Vivo* de Anticorpos C5 anti-humanos

Tempo (Dia)	#	% de Hemólise da trilha clássica em 10% de soro de camundongo, 60 min, Média±SEM		
		H4H12166P	Comparador 1	Comparador 2
1	22	NS	NS	NS
10	4	12,6±7,79	10,39±2,88	12,06±9,12
20	5	18,8±8,1	21,59±17,53	65,08±52,87
30	5	13,76±10,9	78,98±40,3	91,67±16,74
40	4	41,71±40,7	101,09±4,01	68,99±42,47
50	4*	62,2±56,6	88,99±17,51	105,14±4,07

Tempo = Tempo em horas após a injeção de dose única; Dia = Dia de estudo; SEM = Erro padrão da média; ND = Não detectado; NS = Sem amostra. *Para o Comparador 2, dia 50, n = três devido à incapacidade de uma amostra ser analisada devido a problemas técnicos

[0315] H4H12166P, Comparador 1 e Comparador 2 inibiram a atividade hemolítica complementar terminal que pareceu correlacionar-se com exposições a anticorpos. O H4H12166P bloqueou mais de 85% da atividade hemolítica até o dia 30, com a atividade retornando aos níveis de base de pré-dose no dia 50. O Comparador 1 e o Comparador 2 bloquearam cerca de 80% da atividade hemolítica até o dia 20 e dia 10, respectivamente, com atividade retornando aos níveis de base pelo dia 30 para ambos.

Experiência 2

[0316] Nesta experiência, as farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos anticorpos anti-C5 H4H12166P, H4H12161P, Comparador 1 e um controle de isótipo foram avaliadas em camundongos C5 humanizados (camundongos homozigóticos para expressão de C5 humano). Os níveis de C5 circulantes totais foram determinados usando um ELISA Human Complement C5 (Abcam, cat # ab125963), que foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. As concentrações médias de C5 humano nos camundongos foram determinadas como 48,98 µg/mL ± 15,1 µg/mL.

[0317] Antes da dosagem do anticorpo, os camundongos

humanizados C5 machos e fêmeas foram estratificados de acordo com os níveis humanos de C5, em média 50 µg/mL. Para cada mAb anti-C5, os coortes de cinco camundongos receberam uma injeção subcutânea (s.c.) de 15 mg/kg única de H4H12166P, H4H12161P, Comparador 1 ou um isótipo de controle. Todos os camundongos foram sangrados pré-dose, 6 horas, 1, 2, 3, 4, 7, 10, 13, 21, 30 e 45 dias após a injeção para análise de PK. Além disso, no dia 59, todos os ratos de cada coorte foram eutanasiados e sangramentos terminais foram coletados para análise de PK e PD. O sangue foi processado em soro e congelado a -80°C até ser analisado.

[0318] As concentrações totais de anticorpos foram determinadas em 12 pontos de tempo e a atividade de hemólise percentual foi determinada em 1 ponto de tempo durante um período de vida de 59 dias. As concentrações totais de anticorpos séricos para cada anticorpo anti-C5 estão resumidas na Tabela 29. Os níveis médios de concentração total de anticorpos versus tempo são mostrados na Figura 6. Os parâmetros PK médios estão descritos na Tabela 30.

Tabela 29: Concentrações médias de IgG total no soro após uma injeção subcutânea única de 15 mg/kg de anticorpos anti-C5 selecionados em camundongos C5 humanizados

Tempo (Dia)	Concentração sérica de Ab (µg/mL) Média±SD			
	H4H12166P	H4H12161P	Comparador 1	Controle de Isótipo
0	ND	ND	ND	ND
0,25	31,2±4,2	43,5±16,3	59,2±24,1	61,5±29,4
1	149,9±16,1	193,8±24,1	179,0±9,8	218,1±17
2	160,8±20	221±26,5	166,6±22,3	188,8±25,8
3	166,2±12,4	210±31,2	159,2±33,2	177,9±26,2
7	158,6±8,5	162,5±34,8	136,1±38,1	184,9±33,9
10	123,5±28,7	133,2±20,2	107,2±45,7	159,5±28,8
13	93,7±23,6	97,2±24,6	70,6±38	117,2±24,1
21	60,4±14,9	42,4±30,3	29,5±20,6	80,0±17,5
30	37,8±10,8	15,3±19,7	4,2±3,5	42,1±6,7
45	20,7±5,2	3,5±5,2	0,4±0,3	16,5±13,9
59	4,1±1,9	0,6±1,0	0,08±0,04	4,6±4,5

Tempo = tempo em horas após a injeção de dose única; Dia = dia de estudo; SD = desvio padrão; SEM = erro padrão da média; ND = Não detectado; NS = sem amostra.

Tabela 30: Parâmetros PK

Parameter	Units	Anticorpo Teste (média ±SD)			
		H4H12166P	H4H12161P	Comparador 1	Controle de Isótipo
C_{max}	µg/mL	178 ± 10	225 ± 22	183 ± 18	221 ± 19
AUC_{last}	d.µg/mL	3490 ± 590	3040 ± 900	2240 ± 780	4080 ± 480
$t_{1/2}$	D	11 ± 1	5,8 ± 2	4,2 ± 1	9,9 ± 4

Cmax = concentração máxima; AUC = Área sob a curva de concentração-tempo; $AUC_{última}$= AUC calculado a partir do tempo zero até ao momento da última concentração positiva; T1/2 = Meia-vida estimada observada.

[0319] Os perfis de concentração média versus tempo mostram que H4H12166P, H4H12161P, Comparador 1 e controle de isótipo atingiram uma concentração sérica máxima (Cmax) entre os dias 1 a 3, com valores de Cmax comparáveis em 1,3 vezes (178, 225, 183 e 221) µg/mL, respectivamente. H4H12166P e controle de isótipo tinham perfis de eliminação similares, com níveis remanescentes de aproximadamente 4µg/mL no dia 59. H4H12161P exibiu depuração mais rápida que H4H12166P e controle isotípico mas depurou mais lentamente que o Comparador 1. No dia 59, H4H12161P teve nível médio de fármaco sérica de 0,6 µg/mL, enquanto o Comparador 1 tinha um nível de fármaco quase indetectável de 0,08 µg/mL.

[0320] O controle de isótipo, H4H12166P e H4H12161P exibiram valores de exposição comparáveis ($AUC_{última}$) em 1,3 vezes (4080, 3490 e 3040 dia • µg/mL, respectivamente), enquanto o Comparador 1 exibiu uma exposição 1,6 vezes menor (2240 dia • µg/mL) em comparação com H4H12166P.

Exemplo 12: Ensaio baseado em LC-MRM-MS para determinar a concentração de C5 total humano

[0321] Neste Exemplo, as concentrações séricas de C5 total humano foram determinadas usando uma cromatografia líquida acoplada a um método de espectrometria de massa de monitoramento de reação múltipla (LC-MRM-MS) em um estudo farmacocinético/farmacodinâmico do anticorpo anti-C5 H4H12166P.

[0322] As concentrações séricas de C5 total humano foram determinadas medindo a concentração de um peptídeo de 10 aminoácidos contido na sequência C5 LQGTLPVEAR (aa 1129-1138 de SEQ ID NO: 359) como um substituto para C5. Teoricamente, este método também pode detectar o produto de divisão de C5, C5b. No entanto, devido à instabilidade do C5b livre, as concentrações de C5b no soro são geralmente baixas, estando a maioria do C5b ligada às superfícies celulares na forma de complexos MAC (Cooper & Muller-Eberhard 1970, J. Exp. Med. 132: 775). -93; Hadders *et al* 2012, Cell Rep. 1: 200-7). Portanto, as amostras de soro processadas aqui analisadas provavelmente conterão apenas quantidades insignificantes de produto C5b, se houver.

Métodos

[0323] Para o estudo de PK/PD, os camundongos receberam uma dose única de 15 mg/kg de H4H12166P por injeção subcutânea (s.c.). Todos os camundongos foram sangrados Pré-dose e em um dia após injeção para análise PK. Além disso, aos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias após a injeção, os camundongos foram eutanasiados e os sangramentos terminais foram recolhidos para análise de PK e PD.

[0324] O C5 humano foi usado como padrão de referência para calibração; e um peptídeo C5 humano produzido com um resíduo de arginina marcado com um isótopo estável C-terminal foi utilizado como padrão interno (LQGTLPVEAR-$^{13}C_6{}^{15}N_4$). O padrão de referência foi utilizado em concentrações variando de 3,9 a 250 µg/mL (diluições 1: 2 em série) no soro de camundongos nocaute C5 gerados internamente, nos quais o gene C5 de camundongo foi deletado (C5 -/-). Soro de camundongos C5 -/- também foi usado como controle negativo (branco). Padrões de calibração, amostras e soro de estudo (10 µL cada) foram secos e depois desnaturados em 100 µL de tampão Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) 8 M ureia/20 mM a 37°C por 1 hora. Em seguida, 10 µL

de 25 nM padrão interno foi adicionado a todas as amostras. As amostras foram alquiladas com 10 mM de 2-iodoacetamida em temperatura ambiente durante 30 minutos e foram diluídas utilizando 50 mM de bicarbonato de amônio até um volume final de 500 µL. As amostras foram então digeridas por tripsina (1:20 p/p) durante a noite a 37°C. O peptídeo tríptico LQGTLPVEAR derivado de C5 foi detectado e quantificado por LC-MRM-MS utilizando um sistema Waters Xevo TQ-S com ACQUITY UPLC. Cada amostra processada (10 µL) foi injetada em uma coluna ACQUITY UPLC BEH C18 pré-equilibrada. O caudal foi de 0,6 ml/min (fase móvel A: água: ácido fórmico/100: 0,1 [V:V] e fase móvel B: acetonitrila: ácido fórmico/100: 0,1 [V: V]). O tempo de retenção e a área do pico foram determinados usando o software Masslynx Analyst Data (Waters). As concentrações de analisado C5 foram calculadas a partir da curva de calibração que foi construída representando graficamente a relação de área de pico do padrão de referência C5 (peptídeo C5 NO: marcado LQGTLPVEAR-12C614N4 gerado por digesto tríptico de hC5) para padrão interno (peptídeo C5 marcado com isótopo estável) versus concentração nominal do padrão de referência C5. As concentrações foram calculadas usando regressão linear. A menor concentração do padrão de referência C5 (3,9 µg/mL) estava dentro da faixa dinâmica do ensaio e foi definida como o LLOQ do ensaio.

Resultados

[0325] Concentrações de C5 humano total no soro foram avaliadas para amostras colhidas e via sangramento da cauda antes da dosagem (Pré-dose) e via sangramento terminal nos dias 10, 30 e 35, dos animais correspondentes. As concentrações totais de hC5 após a dosagem de H4H12166P foram semelhantes (dentro de ~ 1 a 0,9 vezes) para predizer os níveis nos dias 10, 30 e 35 após a dosagem. As diferenças menores observadas não foram estatisticamente significativas,

conforme avaliado pelo teste de Mann-Whitney usando o software GraphPad Prism. A análise da relação molar C5/H4H12166P demonstrou que H4H12166P permaneceu em excesso molar de C5 ao dia 35 após a administração (Tabela 31).

Tabela 31: Resumo das características de PD do H4H12166P

Dia após dose	% de CP Hemólise Média±SD	% de Inibição	C5 (µg/mL)			H4H12166P (µg/mL) Média±SD	Terminal de relação molar C5: H4H12166P
			Pré-dose	Terminal	Mudança de Duplicação		
0	77,2	0	n/d			n/a	n/a
10	5,2	93	34,2	30,0	1,0	78,8	0,3
30	7,4	90	31,9	28,4	0,9	30,4	0,8
35	6,0	92	36,1	32,7	1,0	29,6	0,9
40	37,1	52	n/d			20,9	n/d
50	Todos os animais em grupo excluídos devido a títulos de MAHA > 1000						
60	73,57	5	n/d			5,9	n/d

[a]Percentual da inibição da atividade hemolítica de CP foi calculada a partir dos valores médios da% de hemólise da PC na dose diurna indicada em relação ao valor médio da hemólise da PC no dia 0. [b]Mudança de Duplicação = terminal (indicado dia após a dosagem) C5: Pré-dose C5. DP = desvio padrão; MAHA = anticorpo anti-humano de camundongo; não/d = não determinado

[0326] Os animais com dados impactados por MAHA foram completamente excluídos dos cálculos (2x dia 30, 1x dia 35, 2x dia 40 e todos os 4 camundongos no dia 50)

Exemplo 13: Mapeamento de epítopo de ligação de H4H12166P a C5 por permuta de hidrogênio/deutério

[0327] Realizou-se mapeamento de epítopos de permuta de H/D com espectrometria de massa para determinar os resíduos de aminoácidos de hC5 [(aminoácidos M1-C1676 da SEQ ID No: 359) com os quais o H4H12166P interage. Uma descrição geral do método de permuta H/D apresentada em por exemplo, Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267 (2): 252-259; e Engen e Smith (2001) Anal. Chem. 73: 256A-265A.

[0328] Experimentos HDX-MS foram realizados em uma plataforma Waters HDX/MS integrada, consistindo em um sistema Leaptec HDX PAL para a marcação de deutério, um Waters Acquity M-Class

(gerenciador de solvente auxiliar) para a digestão e carregamento da amostra, um Waters Acquity M-Class (gerenciador de solvente binário) para o gradiente analítico de coluna, e espectrômetro de massa Synapt G2-Si para medição de massa peptídica péptica.

[0329] A solução de marcação foi preparada em tampão PBS 10 mM em D_2O em pD 7,0 (equivalente o pH 6,6). Para a marcação de deutério, 3,8 µL de C5 (6 pmol/µL) ou C5 pré-misturado com o anticorpo na relação molar 1 : 1 foram incubados com 56,2 µL de solução de marcação D_2O para vários pontos de tempo (por exemplo, controle não-induzido = 0 seg, marcado durante 1 min e 20 min). A deuteração foi extinta transferindo 50 µL de amostra para 50 µL de tampão pré-resfriado (TCEP a 0,2 M, cloreto de guanidina a 6 M em tampão de fosfato a 100 mM, pH 2,5) e a amostra mista foi incubada a 1,0°C durante dois minutos. A amostra extinta foi então injetada em um Waters HDX Manager para digestão de pepsina/protease XIII online. Os peptídeos digeridos foram retidos em uma pré-coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 µm, 2,1 × 5 mm VanGuard a 0 ºC e eluídos para uma coluna analítica ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 µm, 1,0 × 50 mm durante uma separação de gradiente de 9 minutos de 5% -40% B (fase móvel A: 0,1% de ácido fórmico em água, fase móvel B: 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila). O espectrômetro de massa foi ajustado em uma tensão de cone de 37 V, tempo de varredura de 0,5 s e faixa de massa/carga de 50-1700 unidades Thomson (Th).

[0330] Para a identificação dos peptídeos de C5 humano, os dados $LC\text{-}MS^E$ da amostra não deuterada foram processados e pesquisados contra o banco de dados, incluindo C5 humano, pepsina, e sua sequência aleatória através do software Waters ProteinLynx Global Server (PLGS). Os peptídeos identificados foram importados para o software DynamX e filtrados por dois critérios: (1) produtos mínimos por aminoácido = 0,3 e (2) limiar do arquivo de replicação = 3. O software

DynamX determinou automaticamente a absorção de deutério de cada peptídeo com base no tempo de retenção e elevada Precisão de massa (<10 ppm) em vários pontos de tempo com 3 réplicas de cada vez.

[0331] Utilizando a coluna pepsina/protease XIII online acoplada à aquisição de dados MSE, foram identificados 189 peptídeos do C5 humano na ausência ou na presença do anticorpo, representando 62% de cobertura da sequência. Cinco peptídeos reduziram significativamente a captação de deuteração (valores delta centroide> 0,9 daltons com valores de p <0,05) quando ligados a H4H12166P e estão ilustrados na Tabela 32.

Tabela 32: Deuteração de peptídeos C5 humanos após ligação a H4H12166P

Resíduos	Deuteração de 1 min			Deuteração de 20 min		
	C5 Centroid H^+	C5+H4H12166P Centroide MH^+	Δ	C5 Centroide MH^+	C5+H4H12166P Centroide MH^+	Δ
591-599	1015,38±0,09	1014,44±0,16	-0,93	1015,64±0,04	1014,60±0,08	-1,04
593-599	769,41±0,11	768,33±0,05	-1,08	769,65±0,01	768,30±0,004	-1,35
775-787	1693,81±0,11	1692,85±0,07	-0,96	1694,06±0,04	1692,96±0,02	-1,10
775-794	2439,62±0,29	2438,42±0,20	-1,20	2440,16±0,06	2439,17±0,21	-0,99
779-787	1141,14±0,04	1140,21±0,05	-0,93	1141,23±0,03	1140,21±0,02	-1,02

[0332] A massa peptídica registrada corresponde ao valor médio da massa MH^+ centroide de três repetições. Estes peptídeos, correspondentes aos aminoácidos 591-599 e 775-794, tinham uma taxa de deuteração mais lenta por ligação a H4H12166P. Estes resíduos identificados também correspondem aos resíduos 591-599 e 775-794 de C5 humanos como definido por Uniprot entrada P01031 (CO5_HUMAN; SEQ ID NO: 359).

Exemplo 14: Efeito de anticorpos anti-C5 na inflamação ocular na Uveíte Autoimune Experimental em camundongos

[0333] O presente estudo foi realizado para avaliar o papel do C5 na uveíte autoimune experimental (EAU). Foram utilizados tanto abordagens experimentais genéticas [C5 nocaute (KO), C3/C5 duplo KO], como farmacológicas (anticorpo anti-C5).

Métodos

[0334] Foram utilizados camundongos C57BL/6J adultos (n = 25,

Jackson labs), C5 KO (n = 13) e C3/C5 KO (n = 8) (Regeneron Pharmaceuticals Inc.). A EAU foi induzida por injeção subcutânea de peptídeo da proteína de ligação a retinoide interfotorreceptor humano (IRBP, New England Peptide) em adjuvante completo de Freund e injeção intraperitoneal de toxina pertussis. Administrou-se mAb C5 anticamundongo ou mAb de controle de isótipo através de injeções subcutâneas a cada 3 dias do dia 5 ao 28. O anticorpo anticamundongo C5 utilizado neste estudo (M1M17628N) incluiu uma HCVR/LCVR de SEQ ID NOs: 362/363. Utilizou-se SPECTRALIS® HRA + OCT (Heidelberg Engineering, Inc.) para avaliar os níveis de inflamação nos dias -1, 7, 14, 21 e 28. Todos os animais foram eutanasiados no dia 28 para a recolha de olhos e sangue. Ensaio de hemólise com/sem C3 humano foi realizado para validar a inibição do complemento. Os dados foram analisados por ANOVA.

Resultados

[0335] Em comparação com camundongos do tipo selvagem, a ocorrência de inflamação (30-50%) e contagem de *cluster* de células vítreas foram significativamente diminuídas em camundongos C5 KO ($p < 0,01$). Pontuações tomografia de coerência óptica (OCT) em camundongos C5 KO também reduziu significativamente 50% na semana 3 ($p < 0,0001$). Curiosamente, em camundongos C2/C5 duplo KO, houve significativamente mais *cluster* de células vítreas e maiores pontuações de doença no dia 28 em comparação com os camundongos do tipo selvagem ($p < 0,05$). Em animais que receberam Ab anti-mC5 (50mg/kg), a incidência de inflamação e os *cluster* de células vítreas foram significativamente menores em comparação com nenhum tratamento ou grupo de controle isotípico no dia 21 ($p < 0,01$). Nas semanas 3 e 4, as pontuações da OCT no grupo tratado com anticorpo anti-C5 foram significativamente menores em comparação com nenhum tratamento ou controle de isótipo ($p < 0,0001$). (Figura 7) Ensaios de

hemólise com/sem C3 humano confirmaram o efeito de inibição do anticorpo anti-C5 na semana 4 (Figura 8).

Conclusão

[0336] A inflamação ocular devido a EAU foi atenuada pela inibição da atividade de C5, quer por deleção genética ou inibição farmacológica com um anticorpo anti-C5 específico. A depleção de C5 atrasou a ocorrência de EAU e reduziu o escore da doença de OCT. Estes resultados indicam que o C5 é um potencial alvo terapêutico para a uveíte autoimune. O anticorpo anti-C5 tem efeito protetor na doença de EAU em camundongos de tipo selvagem. Nossos resultados também sugerem que o C3 pode ser benéfico para a doença de EAU em camundongos.

Exemplo 15: Efeito de anticorpos anti-C5 humanos na Uveíte Autoimune Experimental

[0337] Este Exemplo descreve os efeitos de anticorpos anti-C5 contra C5 humano em um modelo de camundongo de uveíte autoimune experimental (EAU). Os camundongos utilizados para este estudo foram humanizados para expressar proteína C5 humana utilizando a tecnologia Velocigene® (Valenzuela *et al*., 2003, Nat. Biotechnol. 21: 652-659). Os camundongos humanizados foram manipulados para substituir o éxon 2 através do éxon 41 do gene C5 de murídeo com os éxons 2 - 42 do gene C5 humano (descrito na publicação do pedido de patente dos EUA 2015/0313194, aqui incorporado na sua totalidade).

Métodos

[0338] Camundongos adultos, machos, foram imunizados subcutaneamente em cada coxa com 150 µg de peptídeo interfotorreceptor humano ligante de retinoide (IRBP) 1-20 (GPTHLFQPSLVLDMAKVLLD) (SEQ ID NO: 364) (Avichezer *et al* 2000, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41: 127-131) em 0,2 ml de emulsão de CFA, suplementado com a cepa de *Mycobacterium tuberculosis*

H37RA até 2,5 mg/mL. Os camundongos foram então inoculados intraperitonealmente com 1,0 µg de toxina pertussis (PTX) para facilitar a indução da autoimunidade mediada por células, promovendo uma polarização Th1 da resposta imunitária (Thurau *et al*., 1997, Clin. Exp. Immunol. 109: 370-376; Silver *et al*., 1999, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40: 2898-2905). Os pesos corporais dos animais foram monitorados duas vezes por semana.

[0339] Os exames oftálmicos foram realizados no dia 1, antes da indução da EAU e nos dias 7, 14, 21 e 28. Camundongos foram anestesiados com cetamina (120 mg/kg, IP) e xilazina (5 mg/kg, IP). As pupilas foram dilatadas usando uma solução oftálmica de 0,5% de Tropicamida, e a base do olho foi examinado usando uma lente de contato com uma câmera de base em uma plataforma Spectralis Heidelberg (HRA) + sistema OCT (Heidelberg Engineering, Carlsbad, CA, USA).

[0340] Uma série de 61 seções ópticas laterais foram obtidas para cada olho usando a função OCT no sistema Spectralis HRA + OCT (Heidelberg Engineering, Carlsbad, CA, USA). A área de imagem da OCT centrou-se no disco óptico permitindo uma imagem igual acima e abaixo da cabeça do nervo óptico. A espessura da retina foi medida como a distância entre a base da camada de RPE e a membrana limitante interna do olho. As medições foram feitas a 1500 µm do disco óptico, e os valores de 4 diferentes quadrantes da retina (por exemplo, superior, inferior, temporal e nasal) foram calculados para uma média da espessura da retina do olho.

[0341] A gravidade da infiltração de células inflamatórias no vítreo também foi classificada em imagens de OCT, avaliando o número médio de *cluster* de células inflamatórias no vítreo, em quatro exames de OCT laterais que transeccionaram o nervo óptico, por olho.

[0342] Uma escala de 4 pontos foi desenvolvida para avaliação da

gravidade da doença em imagens de OCT (Pontuações OCT) (Tabela 33). Tabela 33: Pontuação da EAU *in vivo* usando Tomografia de Coerência Óptica (OCT)

Grau	**Critérios**
0	Sem alteração
0,5 (Traço)	Infiltração de células inflamatórias menores no vítreo, principalmente perto da cabeça do nervo óptico (<15 *cluster*s)
1	Infiltração de células inflamatórias menores no vítreo, principalmente perto da cabeça do nervo óptico (<25 *cluster*s); pequenas lesões subretinianas focais (manchas cinzentas) na periferia; dobras retinianas menores na periferia; dilatação vascular retiniana; perivasculite e vasculite
2	Infiltração moderada de células inflamatórias no vítreo mais difusa, mas não na periferia distante (<50 *cluster*s); interrupções da camada retiniana; formações de granuloma de tamanho pequeno a médio com pregas retinianas primariamente na periferia; dilatação do vaso; neovascularização coroidal focal menor; perivasculite e vasculite; edema retiniano menor (<10 µm)
3	Infiltração de células inflamatórias difusas moderadas a graves no vítreo (> 50 *cluster*s); rompimentos difusos da camada retiniana e vasos dilatados na camada nuclear interna; formações granulomatosas médias a grandes com pregas retinianas em toda a retina; dilatação vascular retiniana grave; perivasculite e vasculite; neovascularização coroidal difusa moderada; edema retiniano moderado a severo (10-40 µm); descolamentos de retina menores
4	Infiltração de células inflamatórias difusas graves no vítreo (> 70 *cluster*); rupturas da camada difusa e vasos dilatados na camada nuclear interna; formação de granuloma difuso grave com pregas retinianas; neovascularização coroidal difusa grave; perivasculite e vasculite; degeneração da retina ou edema retiniano grave (> 20 µm de perda ou> 40 µm de ganho, respectivamente); grandes destacamentos de retina

Análise Estatística

[0343] As análises estatísticas para dados paramétricos (peso corporal, *cluster* de células inflamatórias no vítreo e espessura da retina) foram realizadas pelo teste one-way ANOVA e teste de comparação múltipla de Tukey. Para dados não paramétricos (pontuações OCT e pontuações histológicas), as análises foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn com o software GraphPad Prism versão 5.0d, relativo aos grupos de isotipia ou sem tratamento. Os dados mostram valores médios ± SEM. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

[0344] Em um primeiro estudo (Estudo A), os camundongos foram tratados por via subcutânea a cada 3 dias a partir do dia 5 com controle

de isótipo anticorpo (50 mg/kg) ou 10 mg/kg ou 50 mg/kg de H4H12170P. O tratamento com 10 mg/kg de H4H12170P resultou em uma redução da inflamação e danos na retina (Figura 9). Os camundongos tratados com 10 mg/kg de H4H12170P também mostraram uma redução estatisticamente significativa nas pontuações da OCT no dia 21 e no dia 28 (Figura 10).

[0345] Em um segundo estudo (estudo B), os camundongos foram tratados por via subcutânea a cada 3 dias a partir do sexto dia com controle de isótipo (10 mg/kg), 3 mg/kg ou 10 mg/kg de H4H12166P ou com Comparador 2 (veja o Exemplo 2 aqui, "Construções de Controle usadas nos Exemplos a seguir"). O tratamento com H4H12166P a 3 mg/kg ou 10 mg/kg produziu uma redução relacionada à dose nas pontuações da OCT que foi estatisticamente significativa nos dias 14 a 28 (Figura 11). O tratamento com 10 mg/kg de H4H12166P em camundongos humanizados C5 iniciando 6 dias após a indução de EAU resultou em uma redução relacionada com a dose na inflamação e danos na retina, conforme determinado pela OCT obtida nos dias 14 a 28 (Figura 12).

[0346] Para ambos os estudos, a avaliação não invasiva em vida pela OCT mostrou um desenvolvimento progressivo de inflamação, aumento da espessura da retina e anormalidades morfológicas em animais controle após a imunização com IRBP.

Conclusão

[0347] Esses experimentos fornecem evidências farmacológicas adicionais de que o C5 desempenha um papel na patogênese da uveíte autoimune. A depleção farmacológica de C5 humano por anticorpos anti-C5 totalmente humanos adiou a incidência de EAU e reduziu a gravidade da doença, estabelecendo a eficácia destes anticorpos na uveíte autoimune.

Exemplo 16: Efeito de anticorpos anti-C5 na lesão de isquemia-

reperfusão renal

[0348] O presente estudo foi realizado para avaliar o papel do C5 na lesão de isquemia-reperfusão renal. Tanto os genéticos (usando camundongos C3 nocaute e C5 nocaute) quanto farmacológicos (usando anticorpos anti-C5) foram utilizados. O modelo de isquemia-reperfusão foi induzido por pinçamento pedicular renal bilateral por 45 min seguido por 48 h de reperfusão. Sham laparotomia serviu como controles. O anticorpo anti-C5 foi administrado por via intravenosa a 50 mg/kg, em dose única, imediatamente após a isquemia (curativa); ou subcutaneamente como duas doses, dia -1 e dia 1 cirurgia (preventiva). O anticorpo anti-C5 utilizado para este estudo foi M1M17628N compreendendo HCVR/LCVR da SEQ ID NO: 362/363. Os marcadores de nitrogênio ureico no sangue (BUN) e creatinina sérica foram utilizados para avaliar os níveis de doença e proteção nos camundongos.

Tabela 34: Variação percentual nos níveis de nitrogênio ureico no sangue em camundongos tratados com anticorpo anti-C5 (M1M17628N) nos modos preventivo e terapêutico

BUN,% de Alteração Vs,	RIRI + Vei	RIRI + Iso. Ctl
	Dia 2	Dia 2
RIRI + M1M17628N (Prev)	-37,19	-34,68
RIRI + M1M17628N (Cur)	- 53,70	-51,85

Tabela 35: Variação percentual nos níveis séricos de creatinina em camundongos tratados com anticorpo anti-C5 (M1M17628N) nos modos preventivo e terapêutico

SCr,% de Alteração Vs.	RIRI + Vei	RIRI + Iso. Ctl
	Dia 2	Dia 2
RIRI + M1M17628N (Prev)	-53,09	-49,34
RIRI + M1M17628N (Cur)	-59,40	-56,16

[0349] Em comparação com camundongos do tipo selvagem, camundongos nocaute C3 e C5 mostraram proteção funcional

significativa no modelo RIRI de lesão renal aguda, como evidenciado pela redução nos níveis de nitrogênio ureico no sangue e creatinina sérica. O anticorpo anti-C5 mostrou proteção funcional no modelo RIRI nos modos preventivo e terapêutico (Tabelas 34-35).

Exemplo 17: Efeito de anticorpos anti-C5 na Nefrite Lúpica

[0350] Este exemplo descreve a eficácia de anticorpos anti-C5 no tratamento da nefrite lúpica em um modelo de camundongo.

[0351] O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é um distúrbio autoimune causado pela perda de tolerância a autoantígenos, produção de autoanticorpos e deposição de complexos imunes fixadores de complemento (CIs) em tecidos lesados. O LES é caracterizado por uma ampla gama de manifestações clínicas e órgãos específicos, sendo a nefrite lúpica uma das complicações mais graves. A ativação do complemento nos rins de pacientes com nefrite lúpica contribui para a inflamação e dano tecidual. A eficácia dos anticorpos anti-C5 no tratamento da nefrite lúpica foi estudada em camundongos NZBWF1, um modelo espontâneo de nefrite lúpica em camundongos (Yang *et al* 1996, PNAS). Os camundongos desenvolvem doença autoimune semelhante ao LES humano, autoanticorpos para antígenos nucleares e proteínas da membrana celular, hipergamaglobulinemia, albuminúria, proteinúria, glomerulonefrite do complexo imune inicial e falência renal e doença renal em estágio terminal entre 35 e 50 semanas de idade.

[0352] Para este estudo, camundongos NZBWF1 com 25 semanas de idade foram tratados subcutaneamente com 30 mg/kg de controle de isótipo, ou anticorpos anti-C5 duas vezes por semana durante 8 semanas seguidos de três vezes por semana durante 10 semanas. Os anticorpos anticamundongo C5 utilizados para este estudo foram M1M17628N e M1M17627N, compreendendo HCVR/LCVR de SEQ ID NOs: 362/363 e 365/366, respectivamente.

[0353] O tratamento com anticorpos anti-C5 melhorou

significativamente a taxa de sobrevivência em camundongos (Figura 13). Ambos os anticorpos melhoraram a albuminúria em 8-14 semanas de tratamento (Figura 14) e os níveis de nitrogênio na ureia no sangue às 12-16 semanas de tratamento (Figura 15).

Exemplo 18: Efeito de anticorpos anti-C5 contra a morte celular de astrócitos

[0354] A neuromielite óptica (NMO) é uma doença autoimune do sistema nervoso central (SNC) que afeta principalmente o nervo óptico e a medula espinhal. Em NMO, os autoanticorpos anti-aquaporina-4 (AQP4-Ab) causam danos aos astrócitos pela ativação da citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Os objetivos deste estudo foram avaliar o papel do sistema do complemento na progressão da NMO e o uso de um anticorpo contra uma proteína do complemento como um potencial tratamento terapêutico para NMO.

[0355] Os astrócitos corticais primários de rato foram obtidos do córtex cerebral de filhotes de ratos após natais e foram cultivados com AQP4-Ab (anticorpo "rAb-53" da Publicação de Pedido de Patente US 2014/0170140; Bennett *et al* 2009, Ann. Neurol 66: 617-629) e proteínas do complemento para demonstrar citotoxicidade mediada por células. Em seguida, as experiências foram repetidas com a adição de um anticorpo anti-C5 para demonstrar o bloqueio da destruição das células astrócitos.

[0356] Para quantificar a morte celular, foi realizado um ensaio de citotoxicidade da luminescência CytoTox-Glo ™. O ensaio utilizou várias concentrações de anticorpos anti-C5 (0,001µg/mL, 0,01µg/mL, 0,1µg/mL, 1µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL ou 1000µg/mL) ou um anticorpo isótipo de controle.

[0357] A fim de determinar se o anticorpo anti-C5 poderia bloquear a CDC induzida por AQP4-Ab, os astrócitos foram plaqueados e o ensaio de citotoxicidade CytoTox-GloTM foi repetido para encontrar

uma dose ideal de AQP4-Ab para esse revestimento. A concentração ideal de AQP4-Ab foi encontrada em 50 µg/mL, e em uma experiência seguinte foi utilizada uma dose constante de AQP4-Ab (50 µg/mL), enquanto a dose do anticorpo anti-C5 foi variada. Como se mostra na Figura 16, foi observada uma diminuição na RLU (em média 300k para, em média, 100k) com quantidades crescentes de anticorpo anti-C5, demonstrando que o anticorpo anti-C5 bloqueou a morte celular de astrócitos. Para ambas as experiências, a RLU não variou com o anticorpo de controle do isótipo. Como mostrado na Figura 16, os anticorpos anti-C5 inibiram a citotoxicidade induzida por AQP4 Ab no astrócito cortical primário com IC_{50} de 15-17 nM.

[0358] Em um estudo subsequente, o anticorpo anti-AQP4 e o anticorpo anti-C5 serão injetados em cérebros de ratos para avaliar a eficácia terapêutica contra a citotoxicidade mediada por complemento de astrócitos no SNC.

Exemplo 19: Ensaio Endotelial

[0359] Este exemplo descreve um ensaio endotelial glomerular *in vitro* para examinar se os anticorpos anti-C5 bloqueiam a deposição de C5b-9 e C3.

[0360] Métodos reproduzíveis para avaliar os efeitos inibitórios de candidatos a fármacos na ativação do complemento são essenciais para o desenvolvimento pré-clínico. Devido à complexidade das vias de ativação do complemento, um ensaio deve usar células e parâmetros relevantes para a indicação terapêutica dada. Aqui, utilizando uma linhagem celular endotelial glomerular humana imortalizada (HGECs), foi validado um modelo de deposição de complemento C3 e C5 para utilização avaliando a atividade bloqueadora de mAbs anti-C3 ou C5.

Métodos

[0361] Células endoteliais glomerulares renais humanas primárias (HGEC; Cell Biologics) foram semeadas durante a noite em meio

completo em placas de 96 cavidades de base claro preta coberta com colágeno I. As células foram tratadas com PBS (controlo) ou ativadas durante 10 min com 10 uM de ADP. Após a lavagem com PBS, adicionou-se soro humano a 50% (preservado em complemento, esgotado em C3 ou depletado em C5) durante 4 horas. Anticorpos anti-C5 foram adicionados a 1 mg/mL ao soro antes do tratamento. As células foram lavadas e fixadas e sondadas com anticorpos anti-C3b (Thermofisher) e/ou anticorpos anti-C5b-9 (Abcam), anticorpos secundários e contrastados com DAPI. As imagens foram capturadas no ImagExpress e a análise de imagens de alto conteúdo foi usada para quantificar a coloração fluorescente para cada imagem e calcular a média por condição.

Resultados

[0362] A deposição de C3 e C5b-9 foi observada em HGECs ativados por ADP expostos ao soro humano normal, mas não em HGECs não ativados (C3: $1,5x10^7 \pm 1,0x10^7$; C5: $7,9x10^6 \pm 6,6x10^6$, $P < 0,05$ vs HGEC não ativado por ADP). A deposição de C3 e C5b-9 foi significativamente reduzida em HGEC ativado por ADP exposto a soro depletado em C3 ou C5 (C3: $3,3x10^5 \pm 4,8x10^4$; C5: $1,5x10^6 \pm 6,0x10^5$, $P <0,05$). A adição de um mAb bloqueador anti-C5 reduziu significativamente a deposição de C5b-9 derivada de soro humano normal em HGEC ativado por ADP, a deposição foi comparável a soro depletado de C5 (mAb C5: $1,02x10^6 \pm 6,0x10^5$, mAb de controle $3,7x10^6 \pm 1,6x10^6$, $P <0,05$ vs. controle de mAb).

Conclusão

[0363] Estes dados demonstram a utilidade de um ensaio endotelial glomerular humano *in vitro* para modelar a deposição de complemento C3 e C5. Além da avaliação *in vitro*, este ensaio oferece potencial como modelo translacional para avaliar estratégias anticomplemento em doenças renais usando amostras de soro derivadas de pacientes.

[0364] A presente invenção não deve ser limitada no escopo pelas modalidades específicas descritas aqui. De fato, várias modificações da invenção para além das aqui descritas tornar-se-ão evidentes para aqueles versados na técnica a partir da descrição anterior e das figuras anexas. Tais modificações destinam-se a cair no escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a C5, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento e/ou composição farmacêutica para tratar ou melhorar pelo menos um sintoma ou indicação de uma doença ou distúrbio associado a C5 em um indivíduo humano em necessidade do mesmo, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a C5 compreende:

uma região variável de cadeia pesada que compreende:

uma HCDR1 consistindo em uma sequência de aminoácidos conforme estabelecida na SEQ ID NO: 100,

uma HCDR2 consistindo em uma sequência de aminoácidos conforme estabelecida na SEQ ID NO: 102, e

uma HCDR3 consistindo em uma sequência de aminoácidos conforme estabelecida na SEQ ID NO: 104; e

uma região variável de cadeia leve que compreende

uma LCDR1 consistindo em uma sequência de aminoácidos conforme estabelecida na SEQ ID NO: 108,

uma LCDR2 consistindo em uma sequência de aminoácidos conforme estabelecida na SEQ ID NO: 110 e

uma LCDR3 consistindo em uma sequência de aminoácidos conforme estabelecida na SEQ ID NO: 112; e

em que a doença ou distúrbio é selecionado do grupo que consiste em síndrome hemolítica urêmica atípica, hemoglobinúria paroxística noturna, degeneração macular relacionada à idade, atrofia geográfica, uveíte, neuromielite óptica, esclerose múltipla, acidente vascular cerebral, síndrome de Guillain Barré, lesão cerebral traumática, doença de Parkinson, um distúrbio de ativação inapropriada ou indesejável do complemento, uma complicação de hemodiálise, rejeição hiperaguda de aloenxerto, rejeição de xenoenxerto, toxicidade induzida

por interleucina-2 durante a terapia com IL-2, um distúrbio inflamatório, inflamação de uma doença autoimune, doença de Crohn doença, síndrome do desconforto respiratório do adulto, lesão térmica, queimaduras, congelamento, uma condição de reperfusão pós-isquêmica, infarto do miocárdio, síndrome de vazamento capilar, obesidade, diabetes, doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia, aterosclerose, vasculite, penfigoide bolhoso, glomerulopatia C3, membranoproliferativa glomerulonefrite, nefropatia diabética, síndrome de Alport, insuficiência renal progressiva, doença renal proteinúrica, lesão de isquemia-reperfusão renal, nefrite lúpica, síndrome pós-bomba em circulação extracorpórea, síndrome pós-bomba em circulação extracorpórea, hemodiálise, isquemia renal, reperfusão da artéria mesentérica após reconstrução aórtica, doença infecciosa , sepse, um distúrbio do complexo imune, uma doença autoimune, um distúrbio renal, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, nefrite por lúpus eritematoso sistêmico, nefrite proliferativa, anemia hemolítica, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, enfisema, embolia pulmonar, infarto pulmonar, pneumonia e miastenia gravis.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio é síndrome hemolítica urêmica atípica.

3. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio é hemoglobinúria paroxística noturna.

4. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a composição farmacêutica é formulada para ser utilizada em combinação com um segundo agente terapêutico.

5. Uso, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o segundo agente terapêutico é selecionado do grupo que consiste em um anticoagulante, um medicamento anti-inflamatório, um anti-hipertensivo, um agente imunossupressor, um agente hipolipemiante, um agente anti-CD20, rituximabe, um agente anti-TNF,

infliximab, um agente anticonvulsivante, um inibidor de C3, um segundo anticorpo anti-C5 e um agente antitrombótico.

6. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a composição farmacêutica é formulada para ser utilizada por via subcutânea, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, oral, intramuscular ou intracraniana.

7. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 98.

8. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 106.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 98 e uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 106.

10. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 353.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 354.

12. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo

compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 353; e uma cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 354.

13. Uso de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo é um anticorpo.

14. Uso de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio é hemoglobinúria paroxística noturna.

15. Uso de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio é miastenia gravis.

16. Uso de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio é neuromielite óptica.

17. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 16, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é formulado para ser utilizado ao indivíduo por via intravenosa e subcutânea.

18. Uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é formulado para ser utilizado em combinação com um segundo agente terapêutico.

FIG. 1

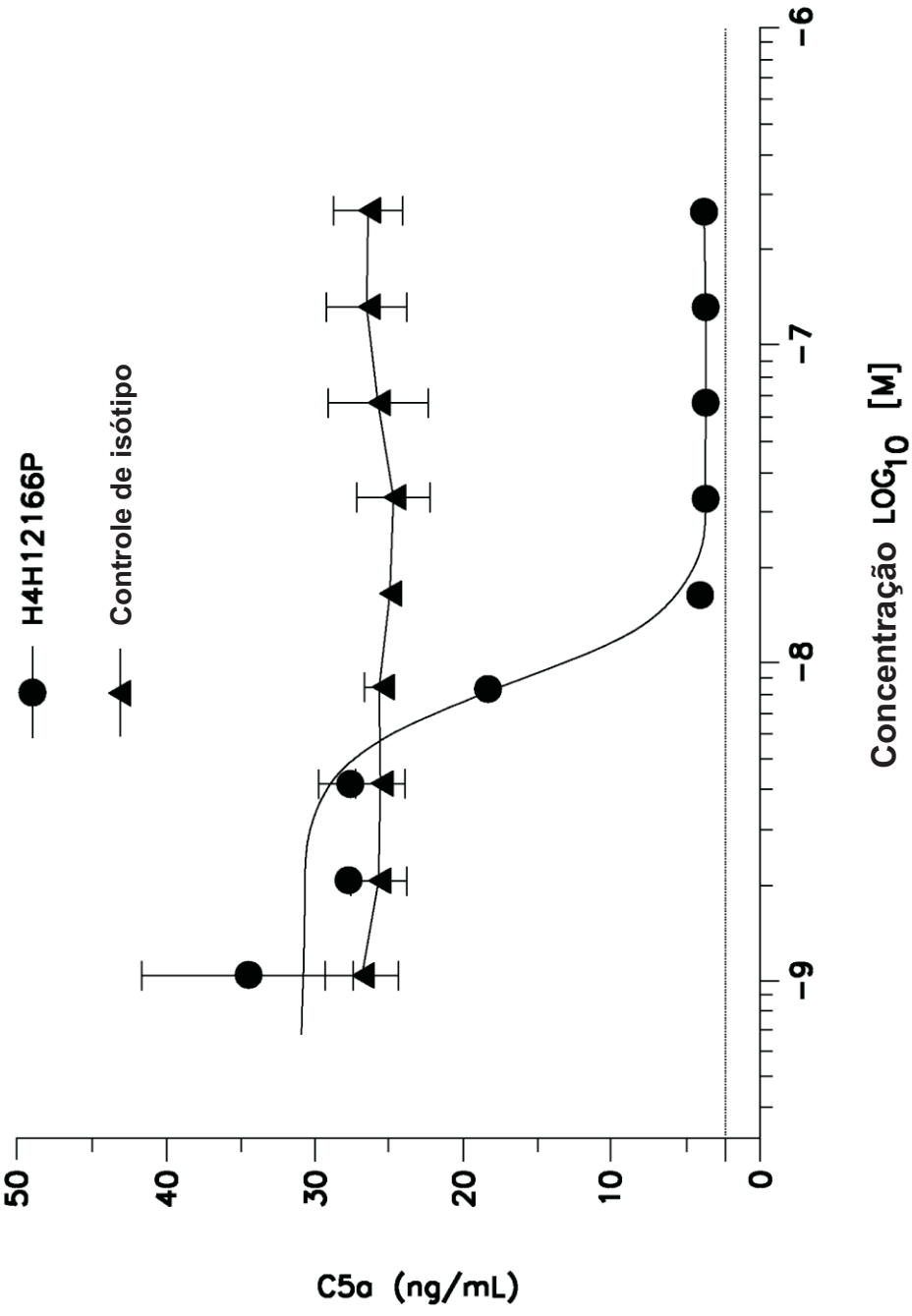
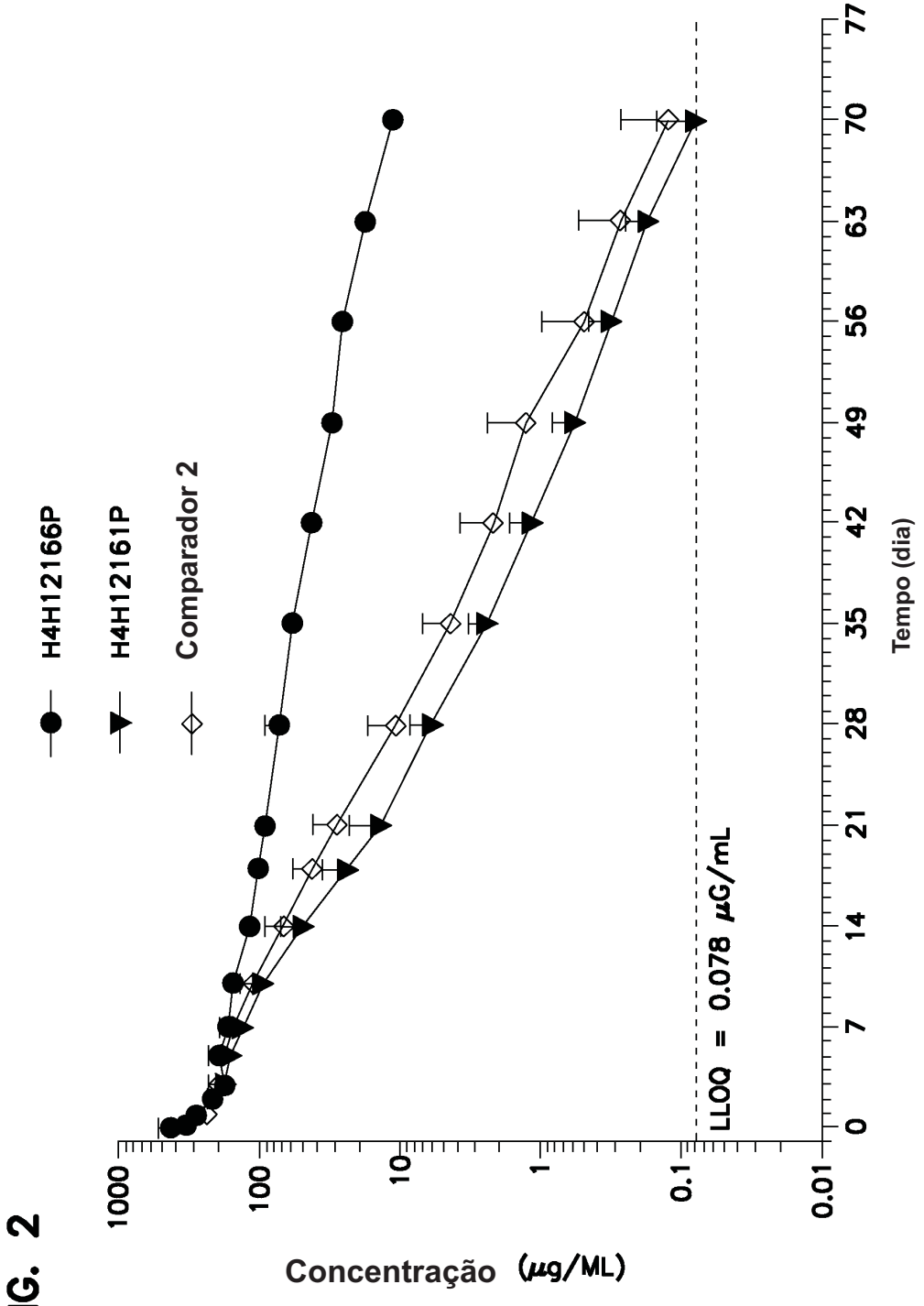

H4H12166P
Controle de isótipo
C5a (ng/mL)
50
40
30
20
10
0
-6
-7
-8
-9
Concentração LOG10 [M]

FIG. 2


H4H12166P
H4H12161P
Comparador 2
1000
100
10
1
0.1
0.01
Concentração (µg/ML)
LLOQ = 0.078 µG/mL
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
70
77
Tempo (dia)

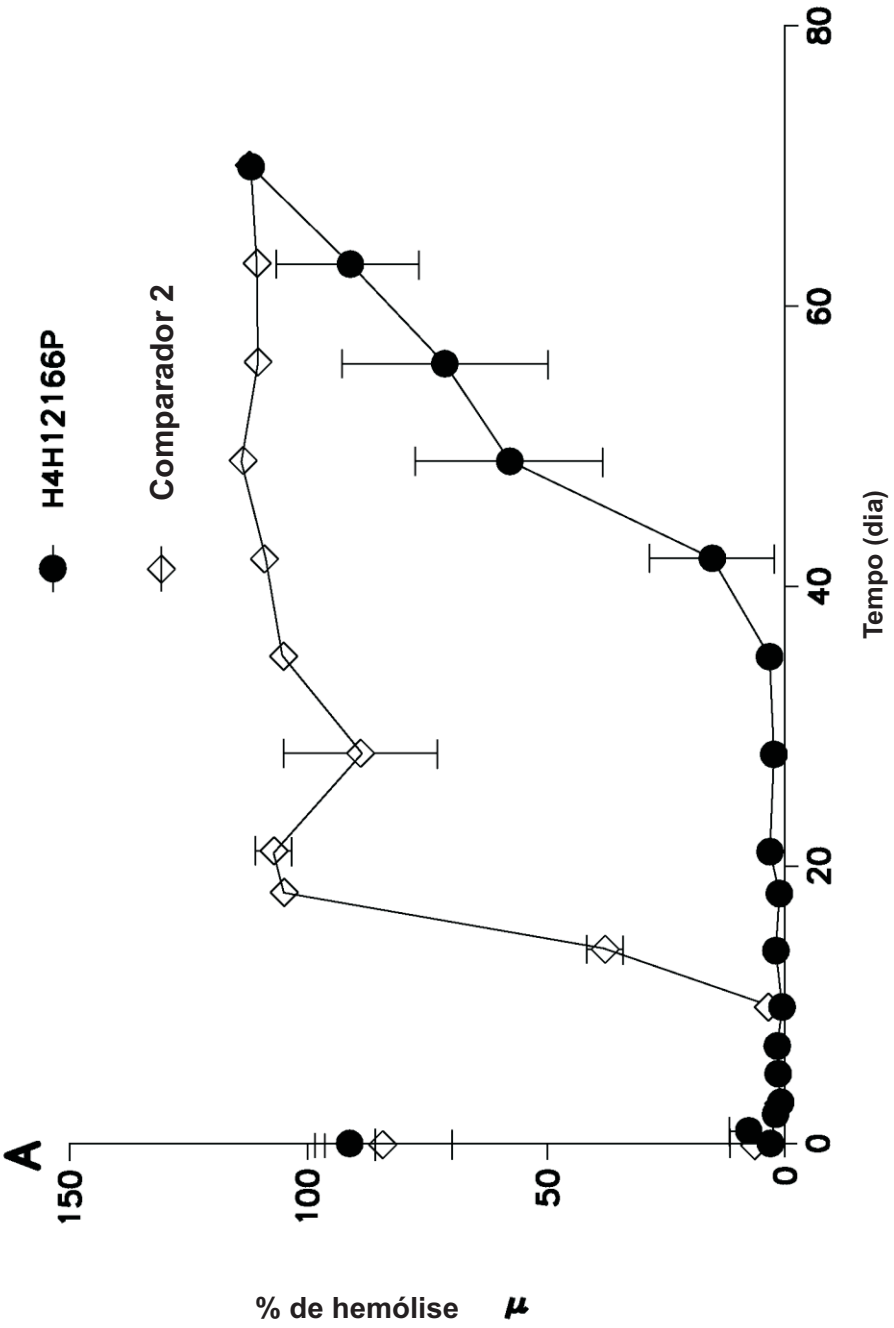

A
H4H12166P
Comparador 2
% de hemólise
Tempo (dia)
150
100
50
0
0
20
40
60
80

FIG. 3A

FIG. 3B

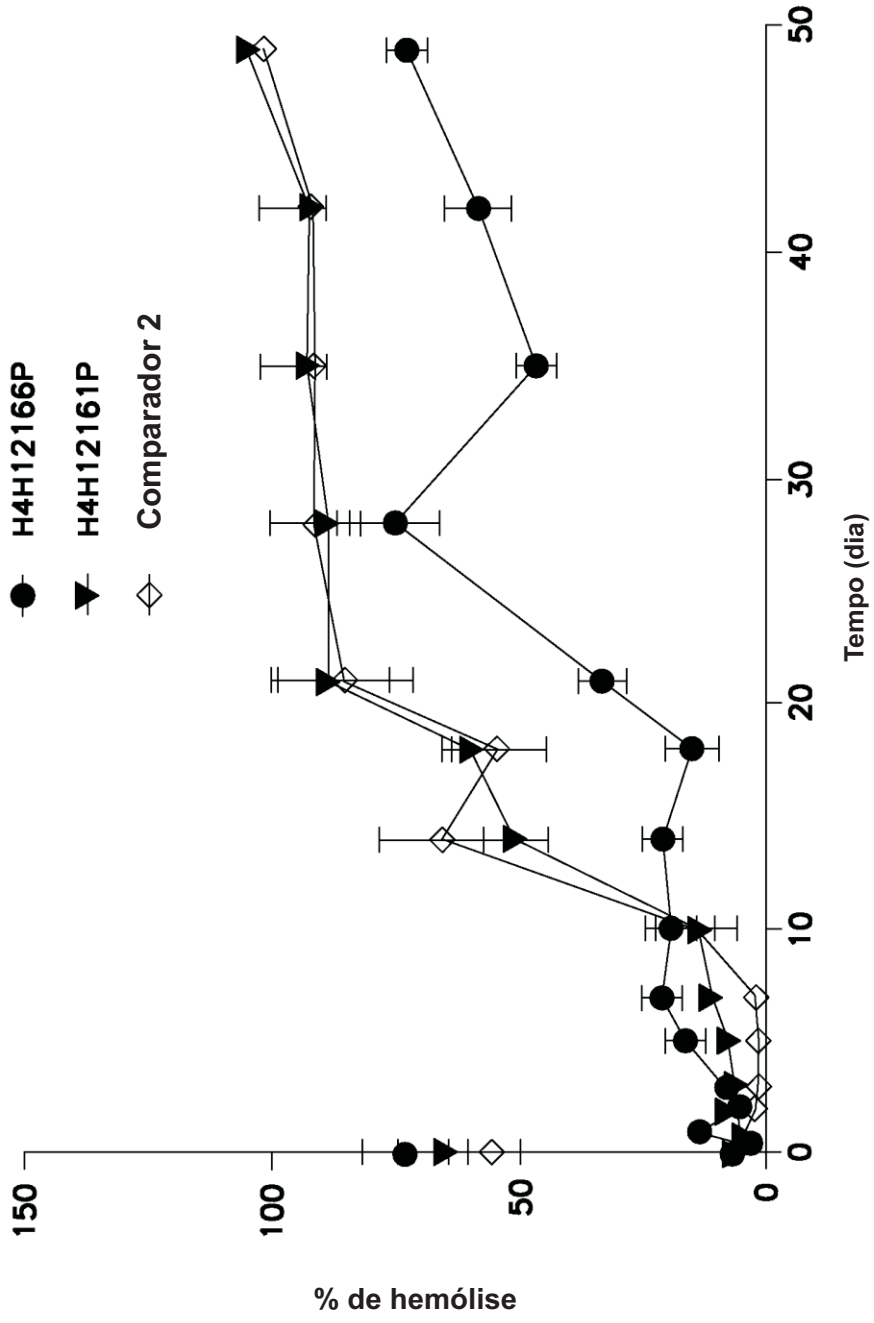

H4H12166P
H4H12161P
Comparador 2
% de hemólise
Tempo (dia)
150
100
50
0
0
10
20
30
40
50

FIG. 4

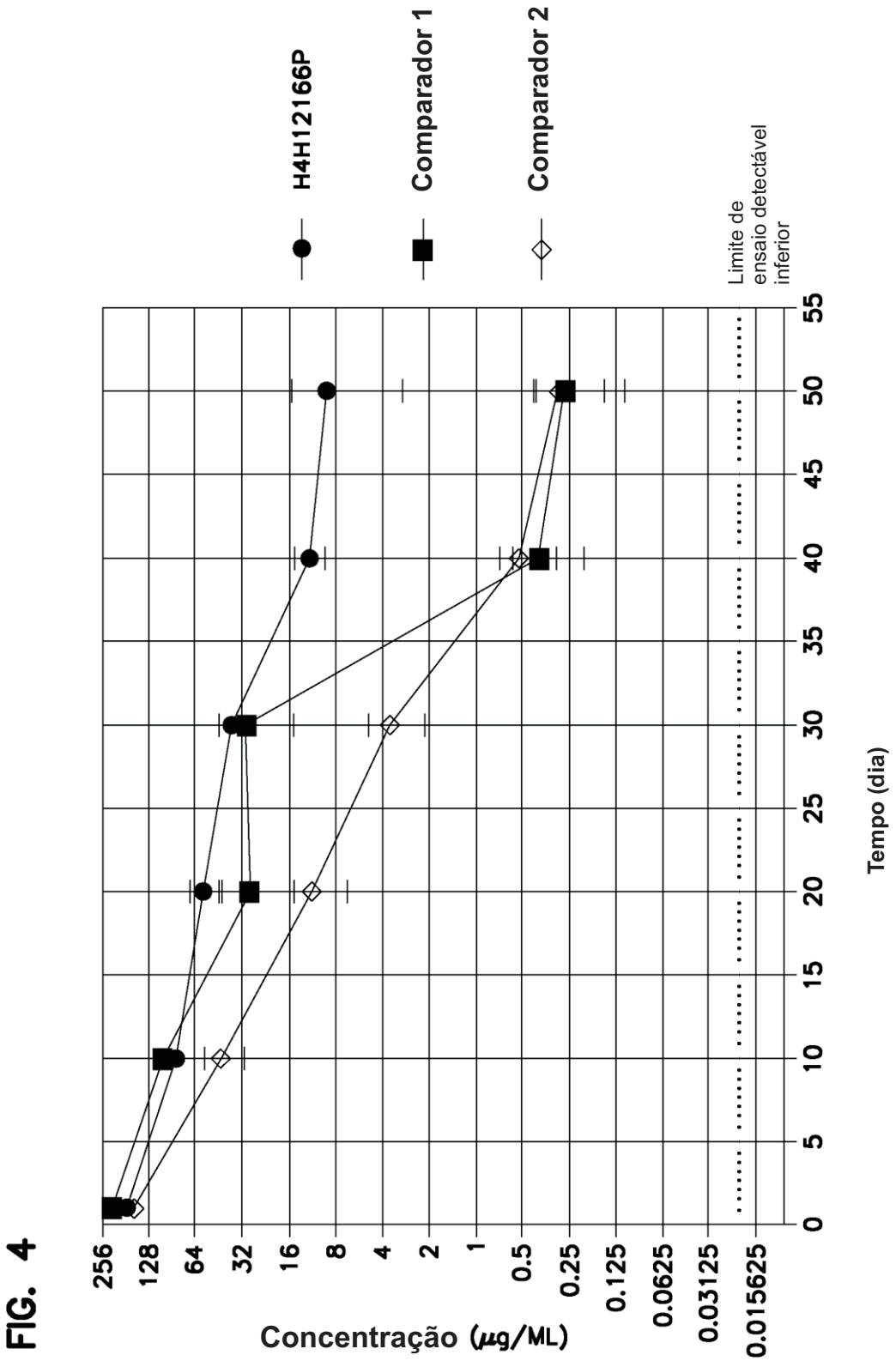

H4H12166P
Comparador 1
Comparador 2
Limite de ensaio detectável inferior
Concentração (µg/ML)
256
128
64
32
16
8
4
2
1
0.5
0.25
0.125
0.0625
0.03125
0.015625
Tempo (dia)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

FIG. 5

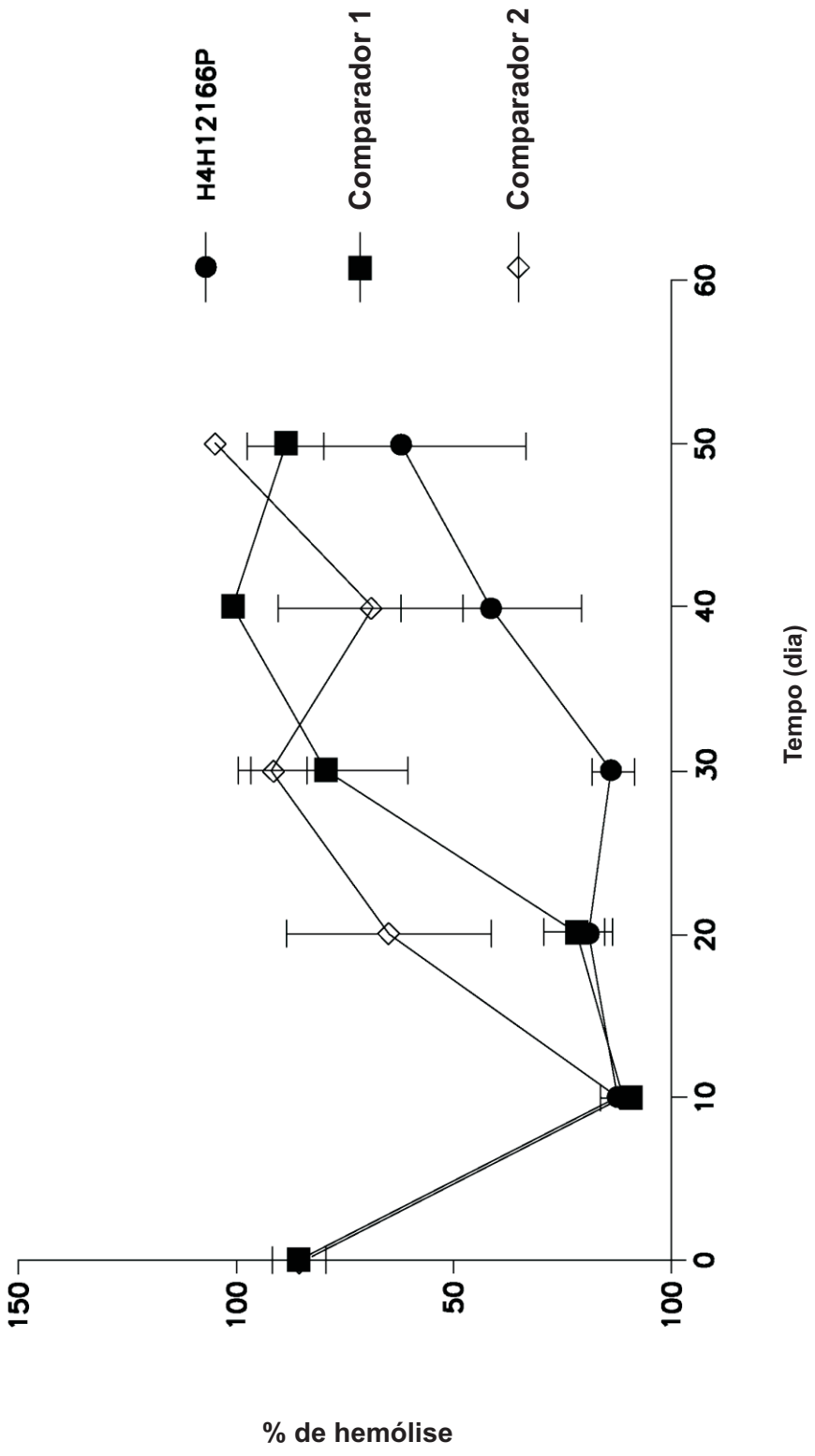

H4H12166P
Comparador 1
Comparador 2
% de hemólise
Tempo (dia)
150
100
50
100
0
10
20
30
40
50
60

FIG. 6

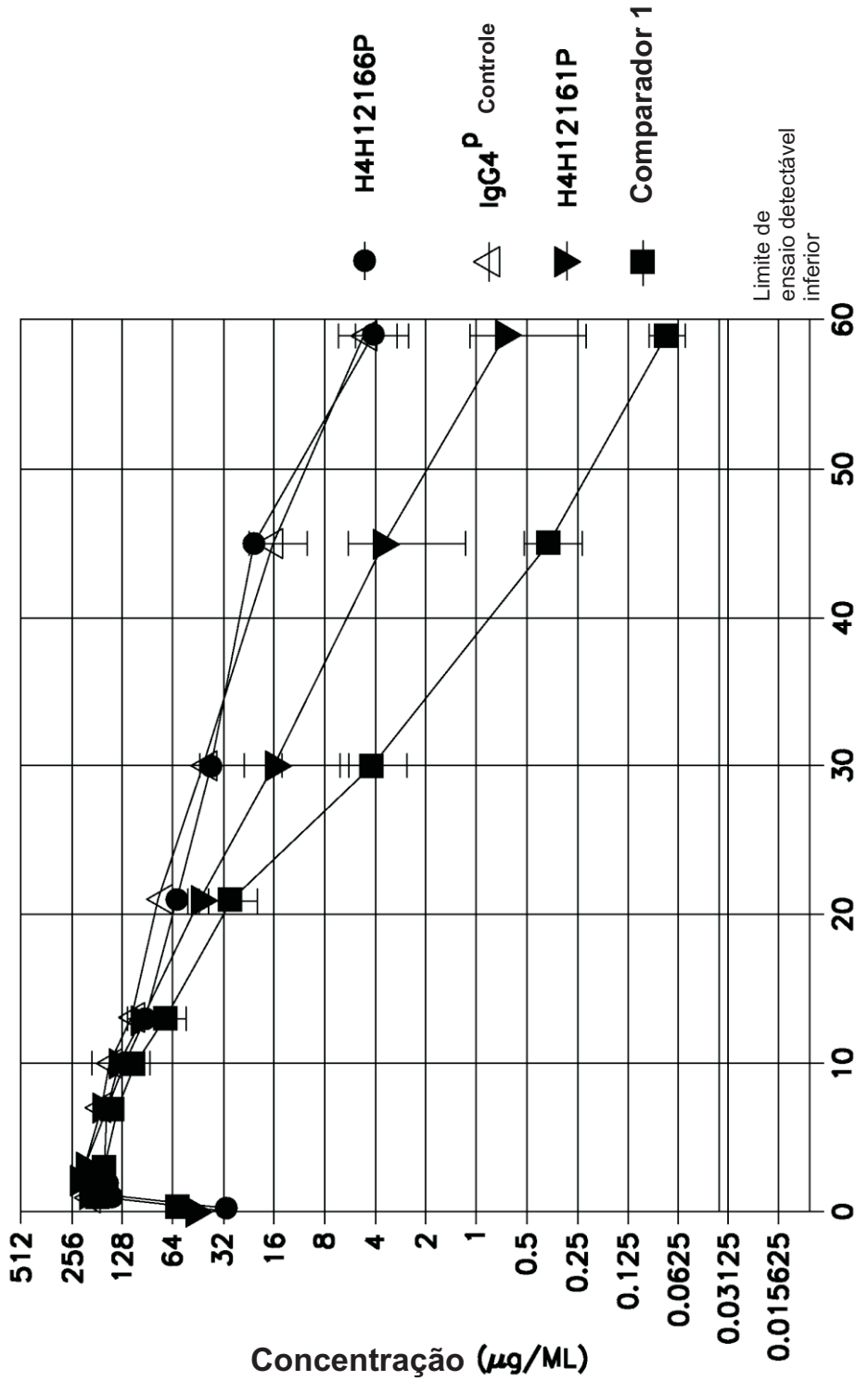

H4H12166P
IgG4P Controle
H4H12161P
Comparador 1
Limite de ensaio detectável inferior
512
256
128
64
32
16
8
4
2
1
0.5
0.25
0.125
0.0625
0.03125
0.015625
0
10
20
30
40
50
60
Concentração (µg/ML)

FIG. 7

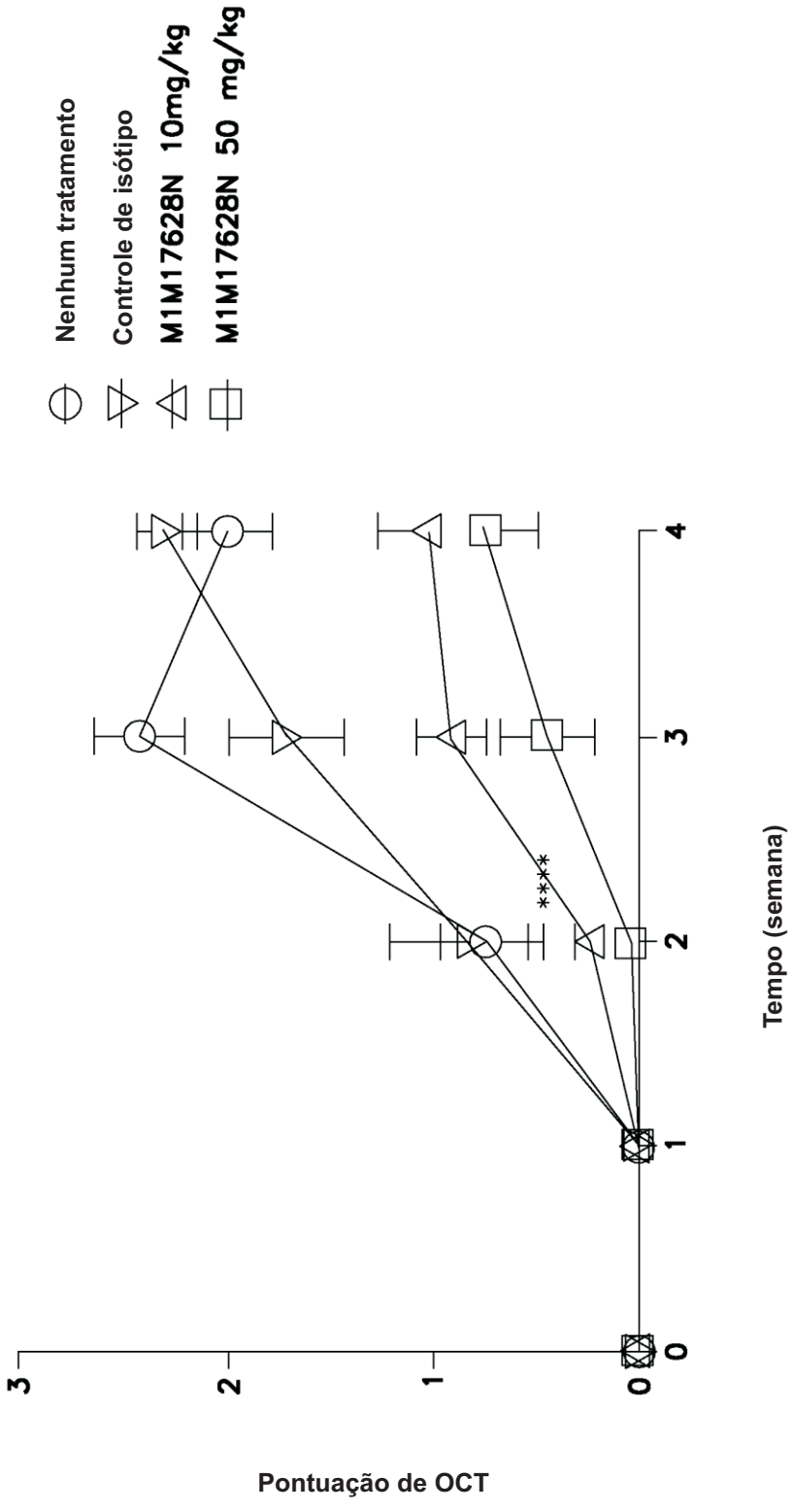

Nenhum tratamento
Controle de isótipo
M1M17628N 10mg/kg
M1M17628N 50 mg/kg
****
Pontuação de OCT
Tempo (semana)
0
1
2
3
4

FIG. 8B

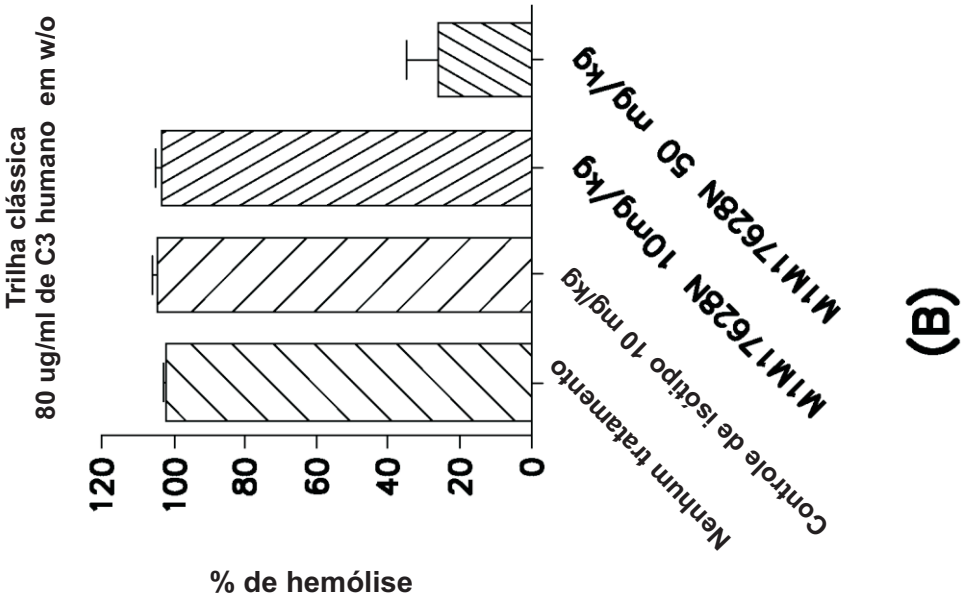
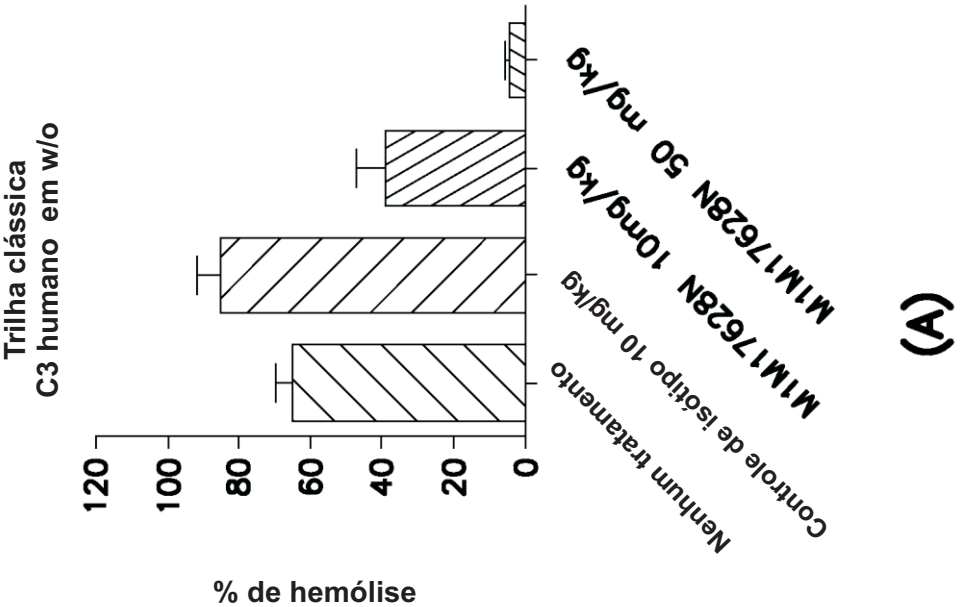

Trilha clássica
80 ug/ml de C3 humano em w/o
% de hemólise
120
100
80
60
40
20
0
Nenhum tratamento
Controle de isótipo 10 mg/kg
M1M17628N 10mg/kg
M1M17628N 50 mg/kg
(B)

FIG. 8A


Trilha clássica
C3 humano em w/o
% de hemólise
120
100
80
60
40
20
0
Nenhum tratamento
Controle de isótipo 10 mg/kg
M1M17628N 10mg/kg
M1M17628N 50 mg/kg
(A)

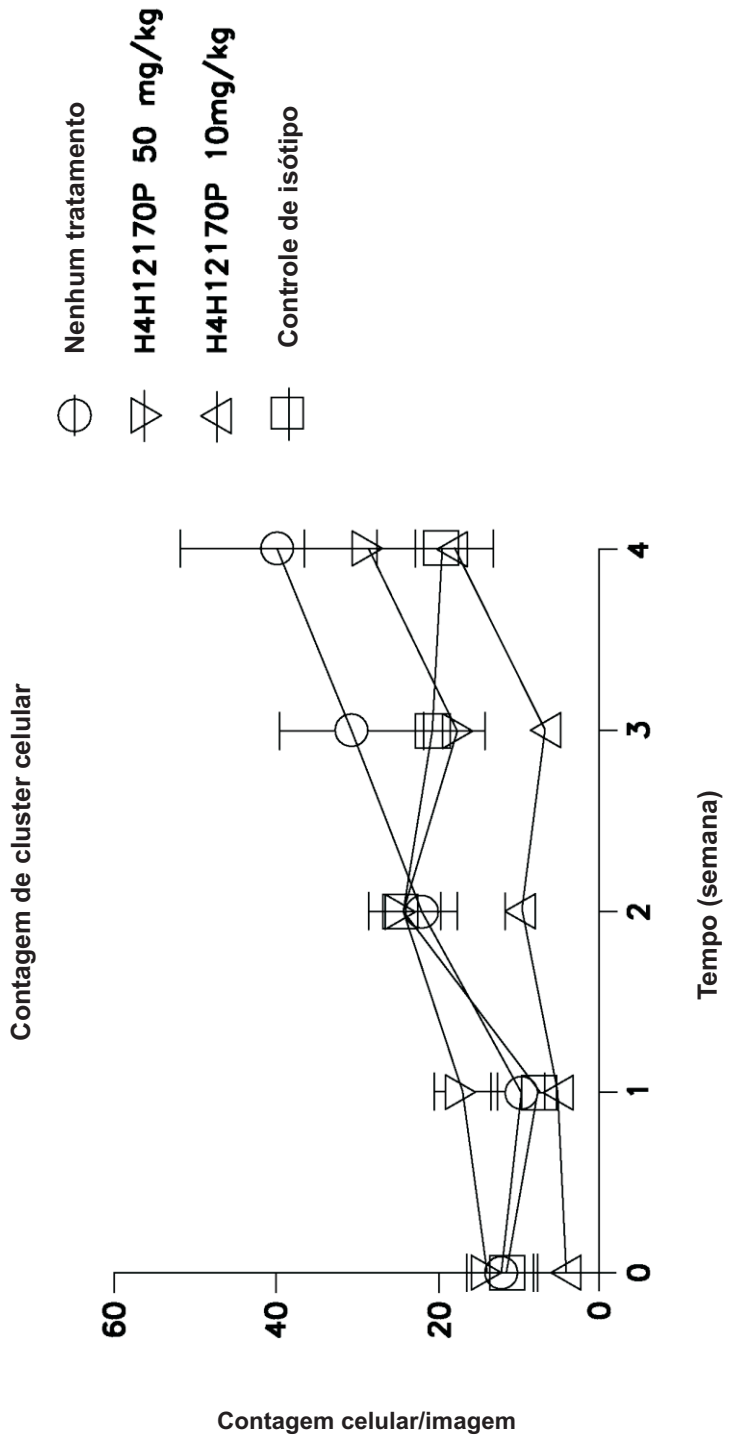

Nenhum tratamento
H4H12170P 50 mg/kg
H4H12170P 10mg/kg
Controle de isótipo
Contagem de cluster celular
Contagem celular/imagem
Tempo (semana)
0
20
40
60
0
1
2
3
4

FIG. 9

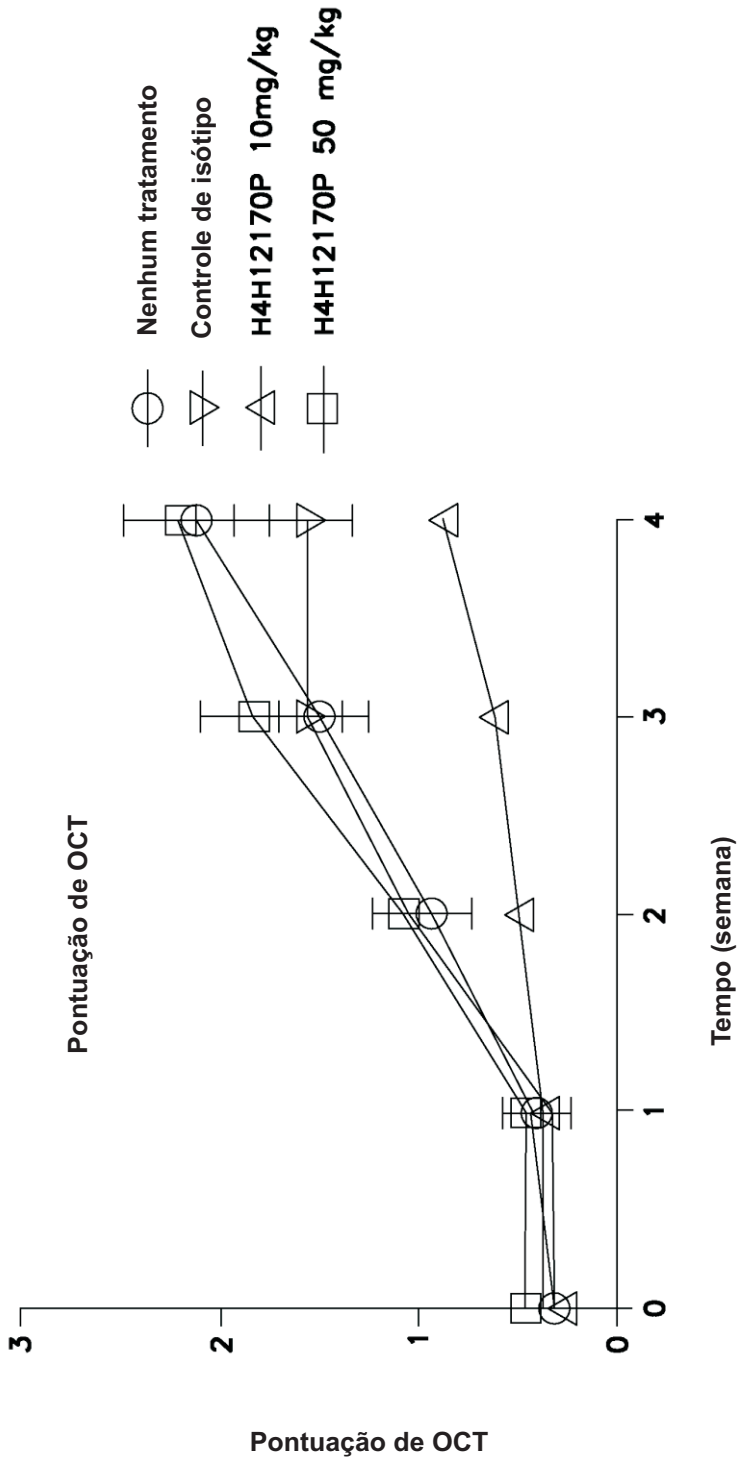

Nenhum tratamento
Controle de isótipo
H4H12170P 10mg/kg
H4H12170P 50 mg/kg
Pontuação de OCT
Tempo (semana)
0
1
2
3
4
Pontuação de OCT
0
1
2
3

FIG. 10

FIG. 11

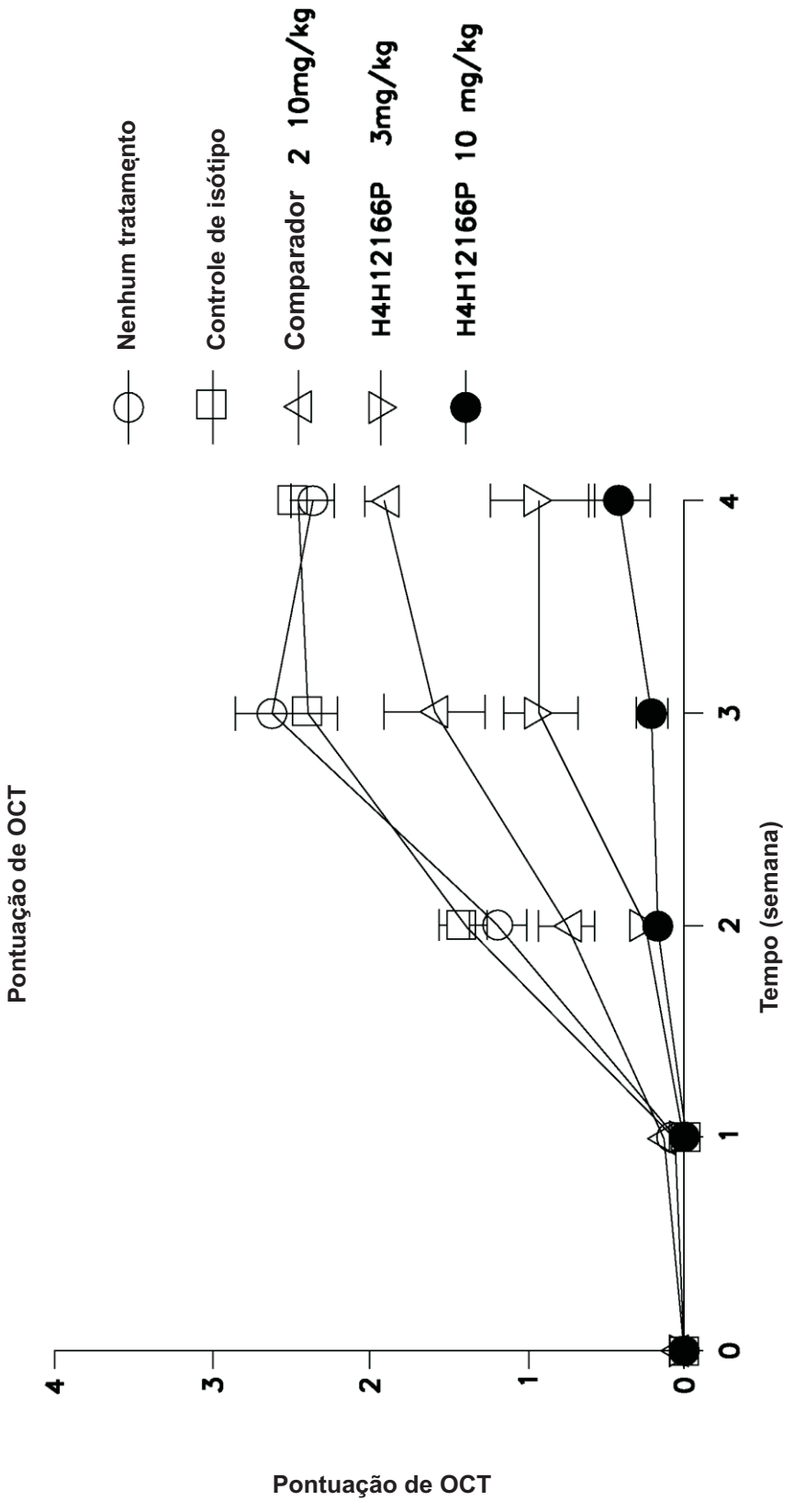
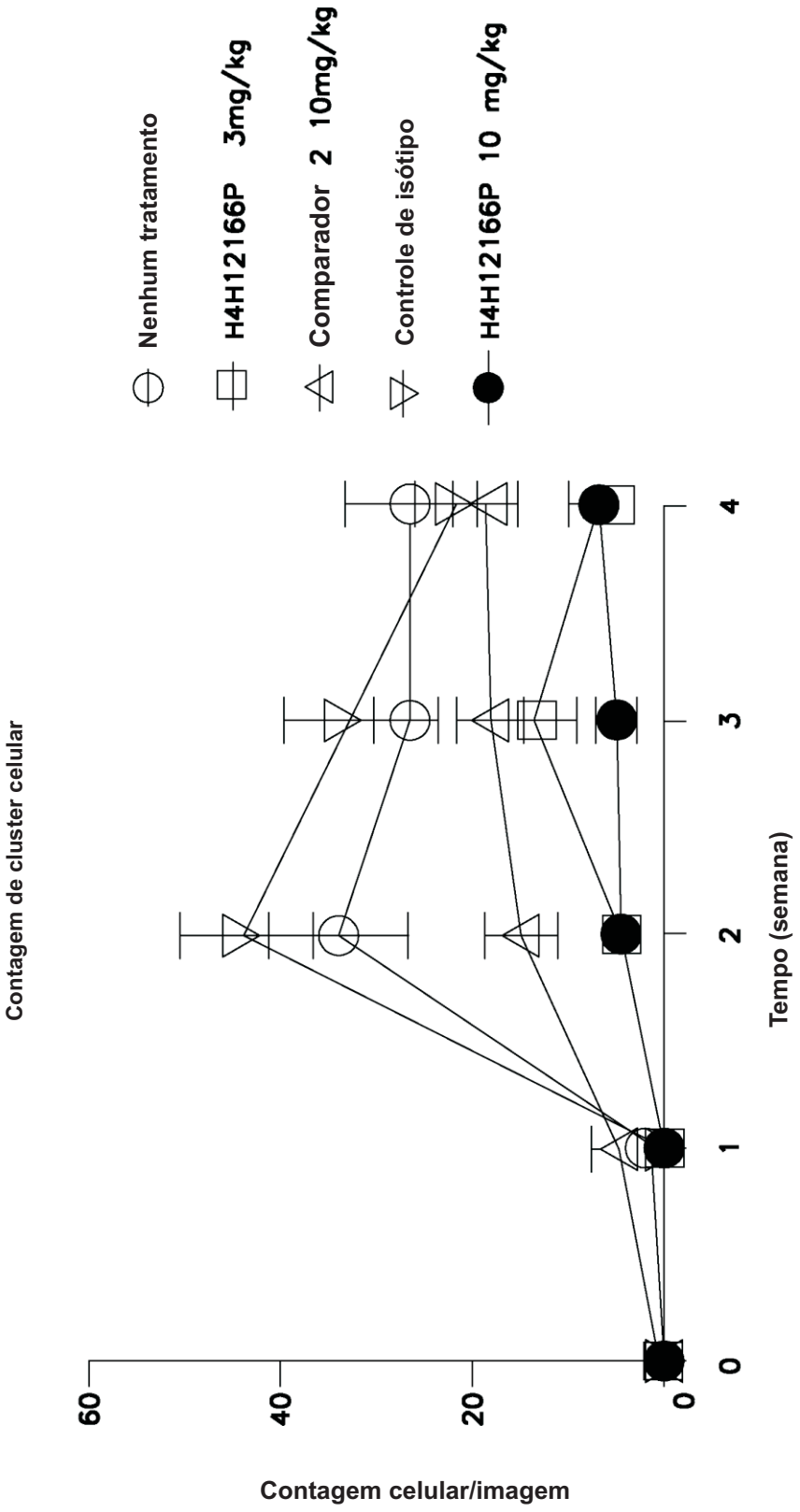

Nenhum tratamento
Controle de isótipo
Comparador 2 10mg/kg
H4H12166P 3mg/kg
H4H12166P 10 mg/kg
Pontuação de OCT
0
1
2
3
4
Tempo (semana)
Pontuação de OCT
0
1
2
3
4

FIG. 12


Nenhum tratamento
H4H12166P 3mg/kg
Comparador 2 10mg/kg
Controle de isótipo
H4H12166P 10 mg/kg
Contagem de cluster celular
Contagem celular/imagem
Tempo (semana)
0
20
40
60
0
1
2
3
4

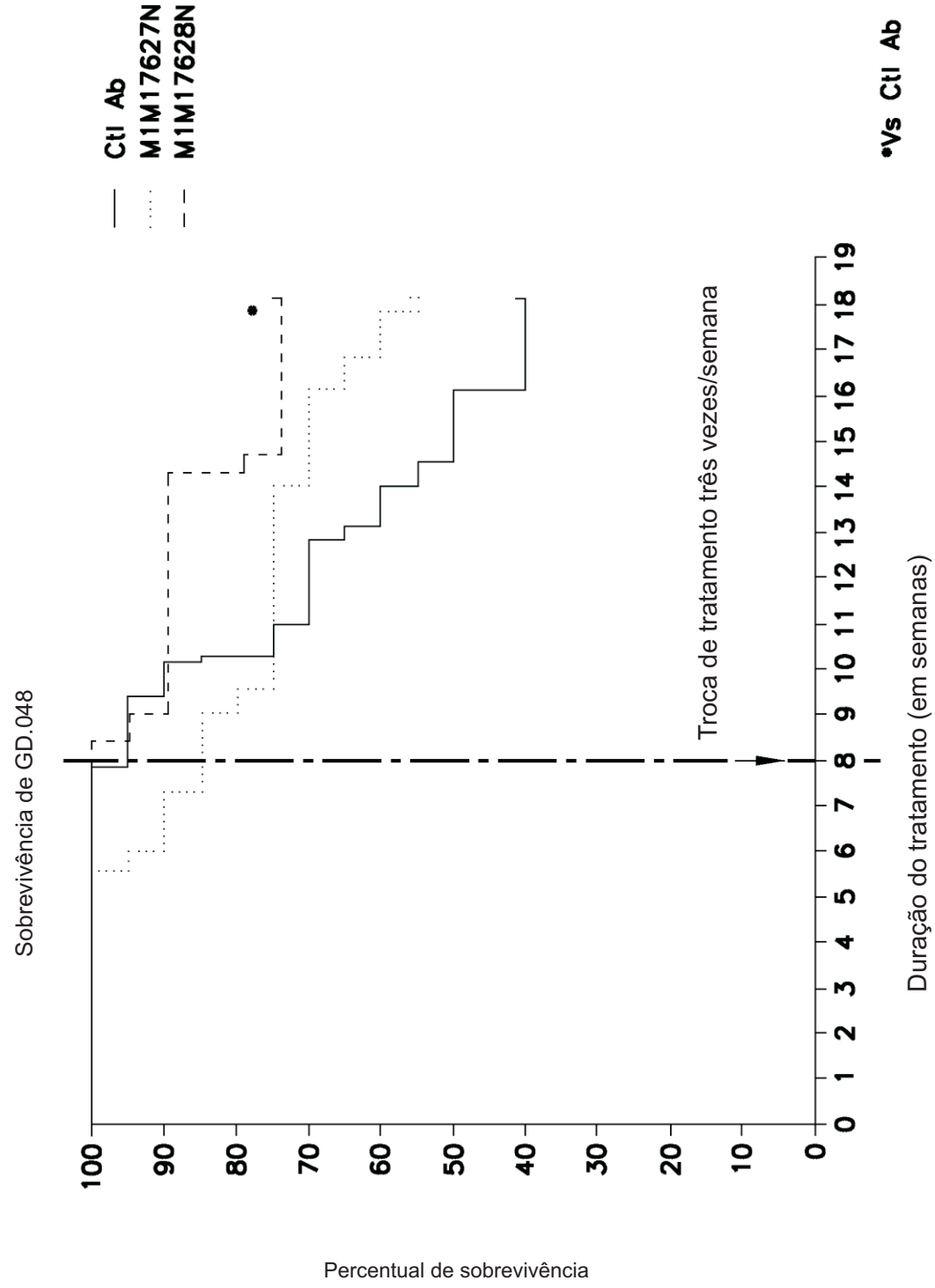

Ctl Ab
M1M17627N
M1M17628N
•Vs Ctl Ab
Sobrevivência de GD.048
Troca de tratamento três vezes/semana
Duração do tratamento (em semanas)
Percentual de sobrevivência
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0

FIG. 13

FIG. 14A

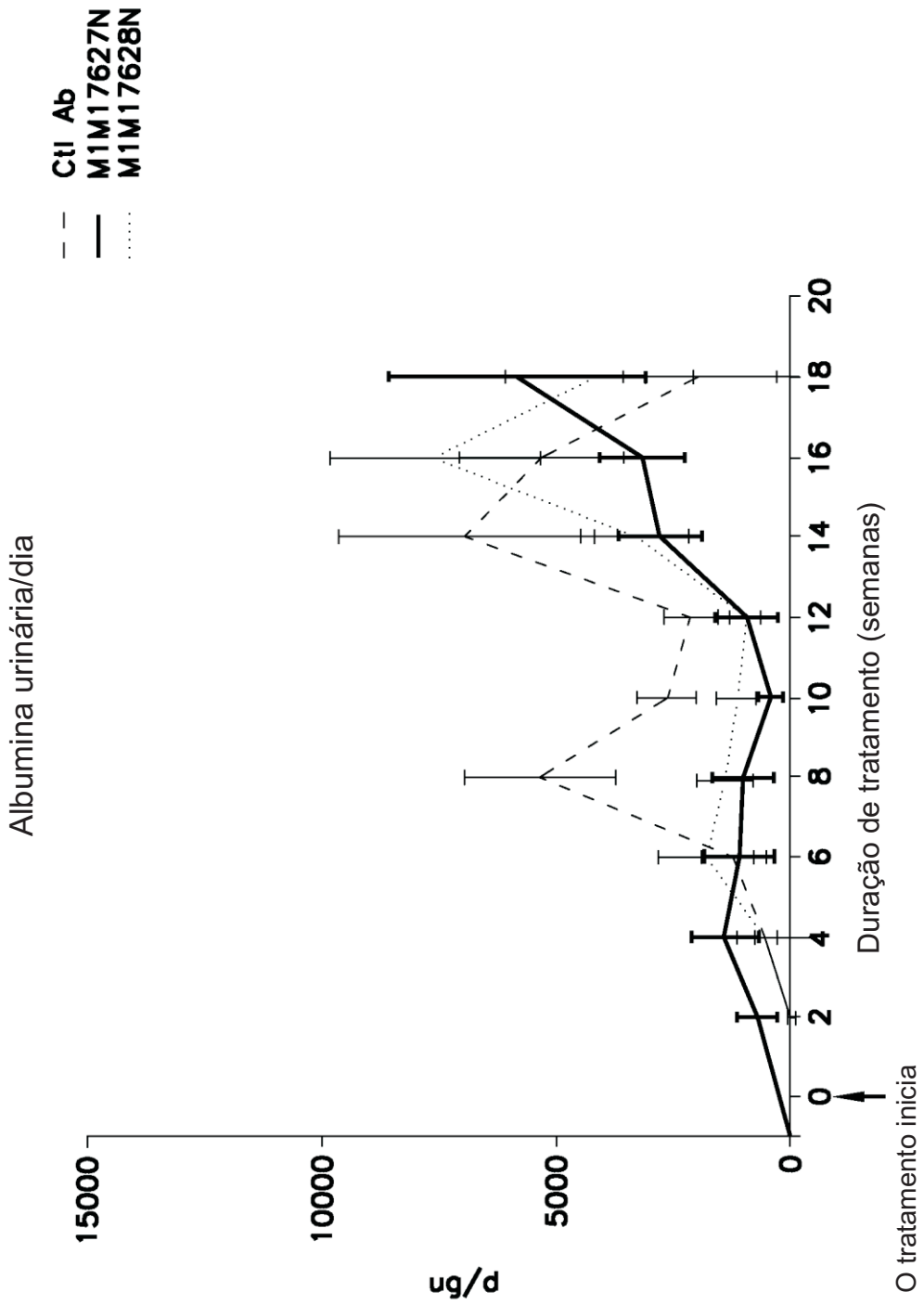
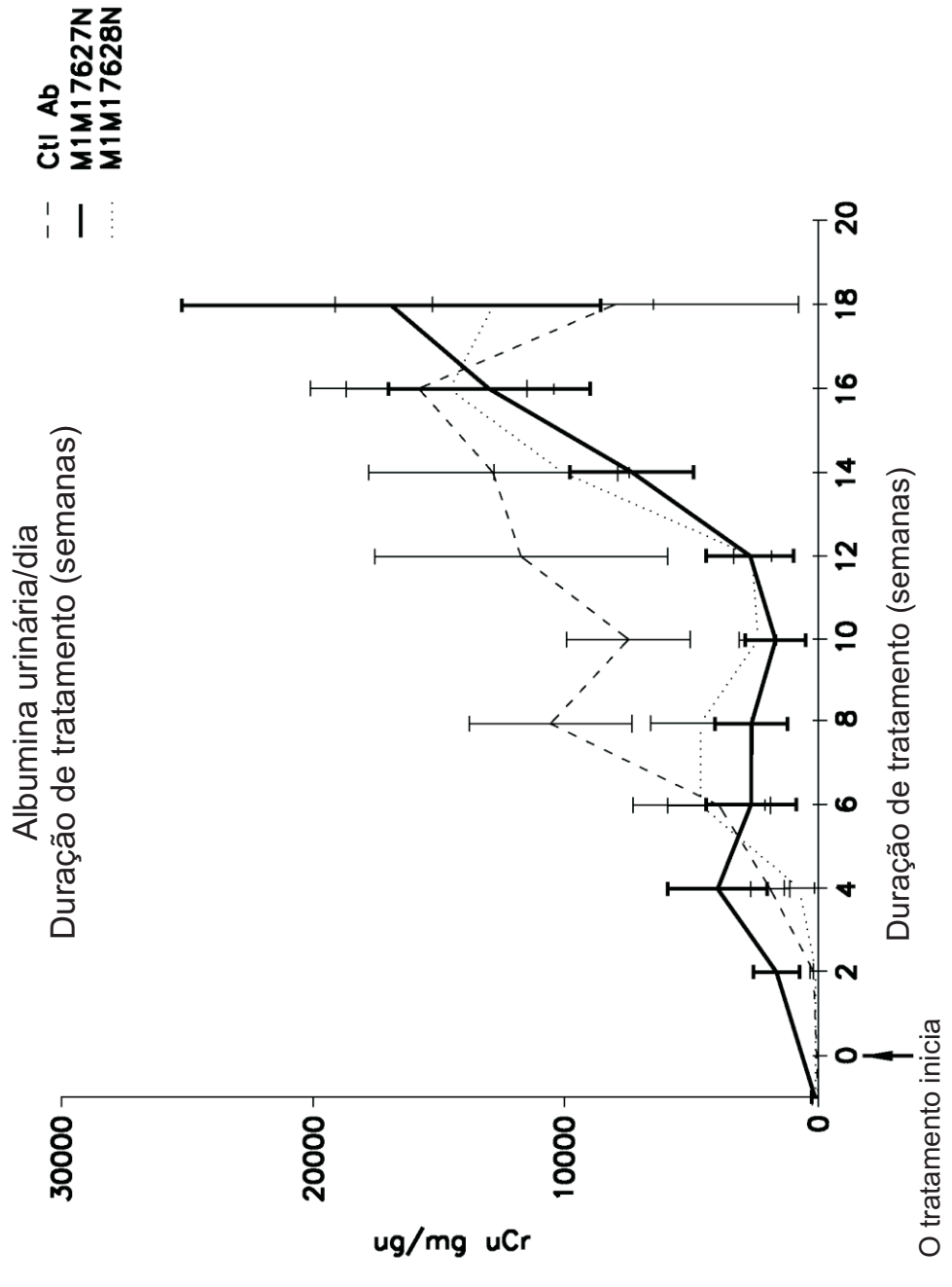

Ctl Ab
M1M17627N
M1M17628N
Albumina urinária/dia
µg/dia
15000
10000
5000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Duração de tratamento (semanas)
O tratamento inicia

FIG. 14B


Ctl Ab
M1M17627N
M1M17628N
Albumina urinária/dia
Duração de tratamento (semanas)
ug/mg uCr
30000
20000
10000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Duração de tratamento (semanas)
O tratamento inicia

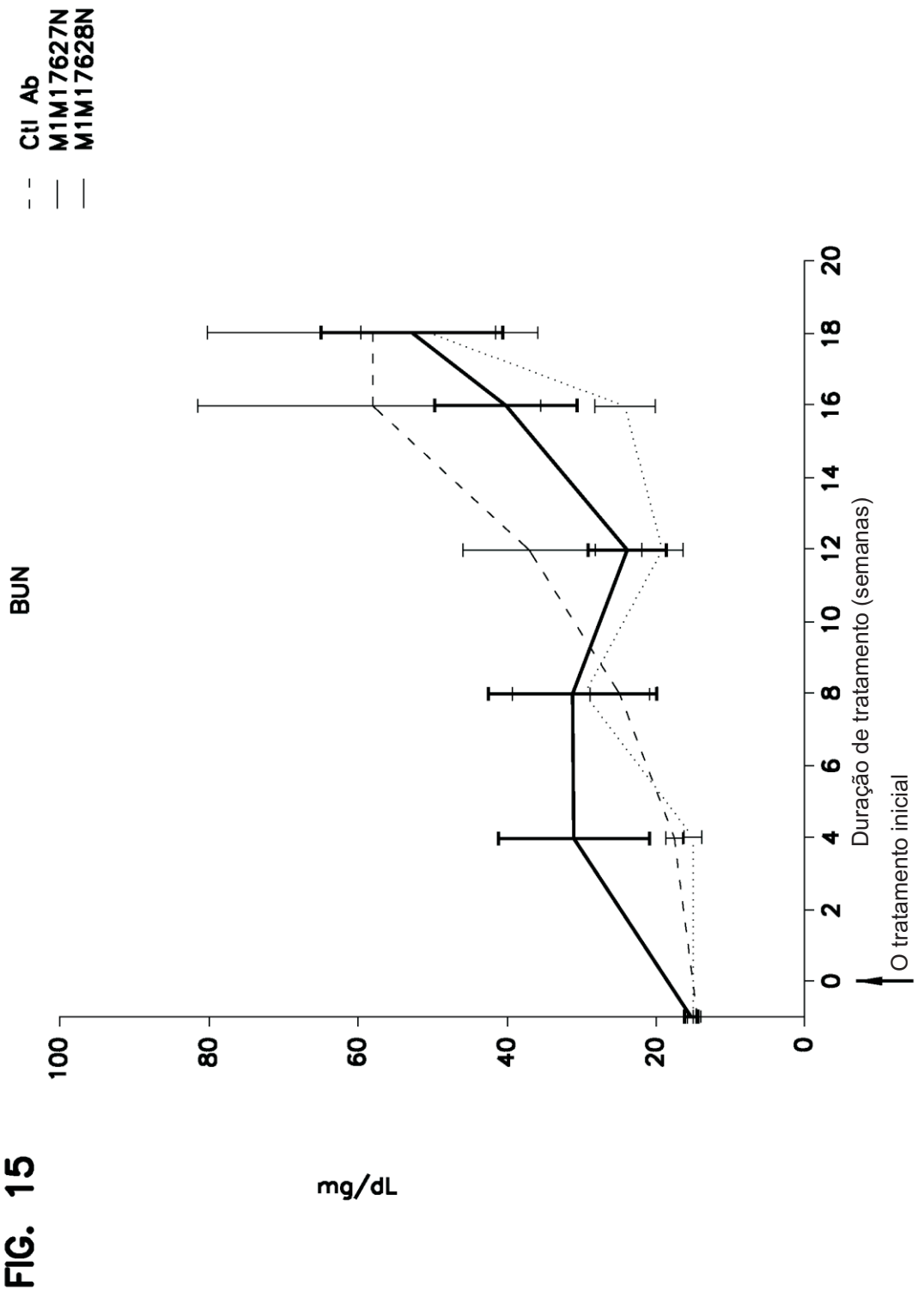
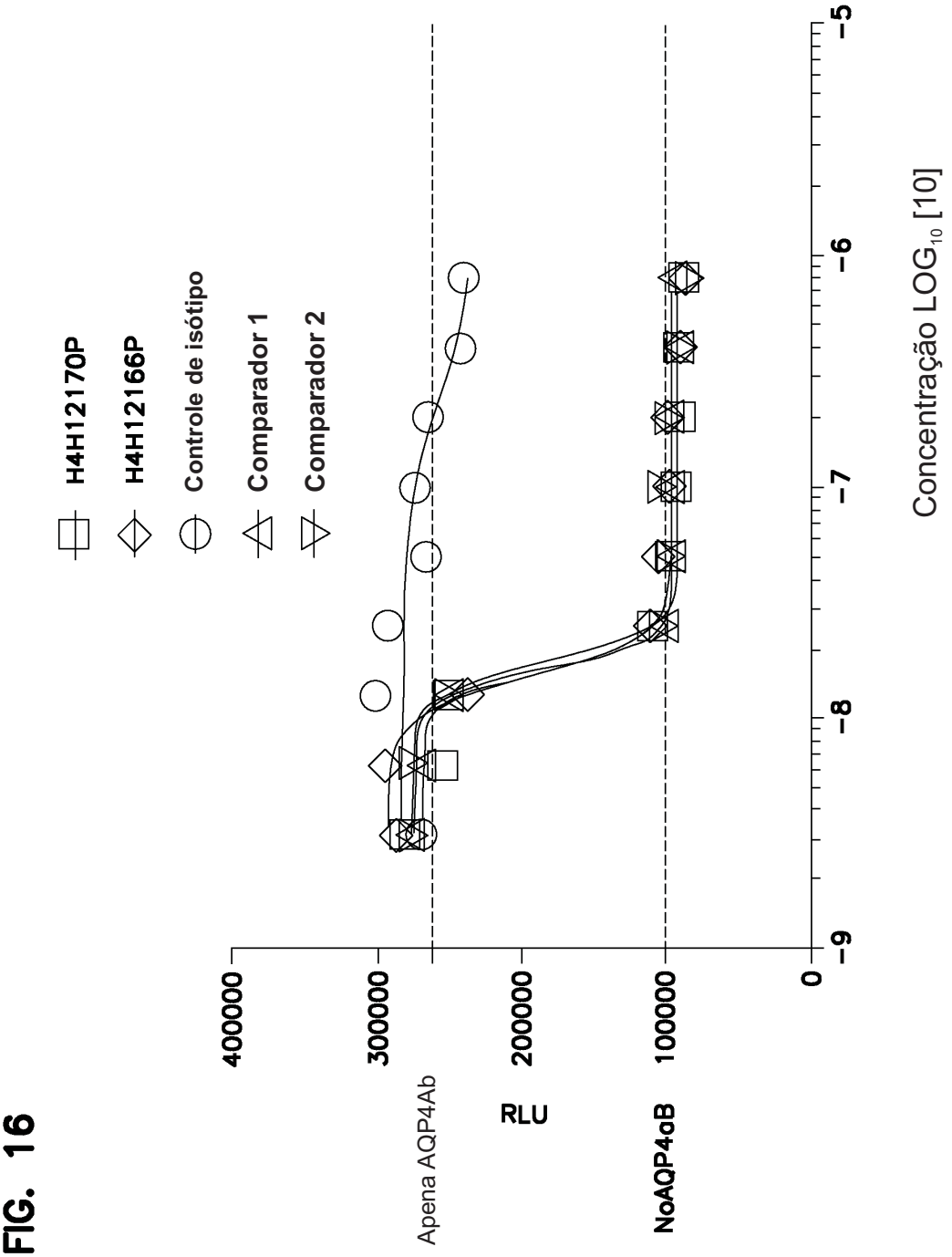

Ctl Ab
M1M17627N
M1M17628N
BUN
mg/dL
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Duração de tratamento (semanas)
O tratamento inicial

FIG. 15

FIG. 16


H4H12170P
H4H12166P
Controle de isótipo
Comparador 1
Comparador 2
400000
300000
200000
100000
0
RLU
Apena AQP4Ab
NoAQP4oB
−9
−8
−7
−6
−5
Concentração LOG10 [10]