

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7102353号

(P7102353)

(45)発行日 令和4年7月19日(2022.7.19)

(24)登録日 令和4年7月8日(2022.7.8)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/18 (2006.01)

C 0 7 K 16/18

Z N A

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

N

A 6 1 P 13/12 (2006.01)

A 6 1 P 13/12

A 6 1 P 13/00 (2006.01)

A 6 1 P 13/00

A 6 1 P 27/02 (2006.01)

A 6 1 P 27/02

請求項の数 21 (全99頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-565286(P2018-565286)

(86)(22)出願日 平成29年6月13日(2017.6.13)

(65)公表番号 特表2019-528039(P2019-528039  
A)

(43)公表日 令和1年10月10日(2019.10.10)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/037226

(87)国際公開番号 WO2017/218515

(87)国際公開日 平成29年12月21日(2017.12.21)

審査請求日 令和2年6月1日(2020.6.1)

(31)優先権主張番号 62/349,705

(32)優先日 平成28年6月14日(2016.6.14)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/405,561

(32)優先日 平成28年10月7日(2016.10.7)

最終頁に続く

(73)特許権者 597160510

リジェネロン・ファーマシューティカル  
ズ・インコーポレイテッドREGENERON PHARMACE  
UTICALS, INC.

アメリカ合衆国10591-6707ニ

ューヨーク州タリータウン、オールド・

ソー・ミル・リバー・ロード777番

(74)代理人 100127926

弁理士 結田 純次

(74)代理人 100140132

弁理士 竹林 則幸

(72)発明者 イン・フー

アメリカ合衆国ニューヨーク州1059

1. タリータウン・オールドソーミルリ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗C5抗体及びそれらの使用

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

補体因子5(C5)タンパク質に特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントであって、ここで抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号100のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域(HCDR)1、配列番号102のアミノ酸配列を含むHCDR2、及び、配列番号104のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域(HCVR)、並びに、配列番号108のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域(LCDR)1、配列番号110のアミノ酸配列を含むLCDR2、及び、配列番号112のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域(LCVR)を含む、上記抗体又はその抗原結合フラグメント。

## 【請求項2】

HCVRは配列番号98に対して少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、そしてLCVRは配列番号106に対して少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

## 【請求項3】

抗体又はその抗原結合フラグメントは、以下の特徴：

- (a) カニクイザルへの投与の際に 70 日目まで  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  より高い血清濃度を有する；
- (b) エクスビボ溶血アッセイで測定して、カニクイザルへの投与の際に 35 日目まで古典的経路 (CP) 溶血を遮断する；
- (c) エクスビボ溶血アッセイで測定して、カニクイザルへの投与の際に 35 日目まで代替経路 (AP) 溶血を遮断する；
- (d) カニクイザルにおいて 10 日より長い血清半減期を有する；
- (e) C5 - ヒト化マウスへの投与の際に 40 日目まで  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  より高い血清濃度を有する；
- (f) エクスビボ溶血アッセイで測定して、C5 - ヒト化マウスへの投与の際に 30 日目まで CP 溶血を遮断する；及び
- (g) C5 - ヒト化マウスにおいて 10 日より長い血清半減期を有する、  
のうちの 1 つ又はそれ以上を有する、請求項 2 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 4】

抗体又はその抗原結合フラグメントは：

- (a) 完全ヒトモノクローナル抗体である；
- (b) 表面プラズモン共鳴アッセイで測定して、25 で  $0.9 \text{ nM}$  未満の解離定数 ( $K_D$ ) でヒト C5 に結合する；
- (c) 表面プラズモン共鳴アッセイで測定して、37 で  $0.3 \text{ nM}$  未満の  $K_D$  でヒト C5 に結合する；
- (d) 表面プラズモン共鳴アッセイで測定して、 $65 \text{ nM}$  未満の  $K_D$  でサル C5 に結合する；
- (e) 表面プラズモン共鳴アッセイで測定して、 $0.5 \text{ nM}$  未満の  $K_D$  でヒト C5 変異体 R885H (配列番号 356) に結合する；
- (f) 表面プラズモン共鳴アッセイで測定して、 $0.5 \text{ nM}$  未満の  $K_D$  でヒト C5 変異体 R885C (配列番号 357) に結合する；
- (g) CP 溶血アッセイで測定して、 $6 \text{ nM}$  未満の  $IC_{50}$  で 95 % より多くヒト C5 媒介古典的経路 (CP) 溶血を遮断する；
- (h) AP 溶血アッセイで測定して、 $165 \text{ nM}$  未満の  $IC_{50}$  で 70 % より多くヒト C5 媒介代替経路 (AP) 溶血を遮断する；
- (i) CP 溶血アッセイで測定して、 $185 \text{ nM}$  未満の  $IC_{50}$  でアフリカミドリザル C5 媒介 CP 溶血を阻害する；
- (j) AP 溶血アッセイで測定して、 $235 \text{ nM}$  未満の  $IC_{50}$  でアフリカミドリザル C5 媒介 AP 溶血を阻害する；
- (k) CP 溶血アッセイで測定して、 $145 \text{ nM}$  未満の  $IC_{50}$  でカニクイザル C5 媒介 CP 溶血を阻害する；及び
- (l) AP 溶血アッセイで測定して、 $30 \text{ nM}$  未満の  $IC_{50}$  でカニクイザル C5 媒介 AP 溶血を阻害する

20

30

からなる群より選択されるさらなる特徴を有する、請求項 2 又は 3 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

40

【請求項 5】

H C V R は、配列番号 98 のアミノ酸配列を含む、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

L C V R は、配列番号 106 のアミノ酸配列を含む、請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 7】

H C V R は配列番号 98 のアミノ酸配列を含み、そして L C V R は配列番号 106 のアミノ酸配列を含む、請求項 5 又は 6 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

50

## 【請求項 8】

抗体である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

## 【請求項 9】

抗原結合フラグメントである、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

## 【請求項 10】

重鎖及び軽鎖を含む請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントであって、ここで重鎖は配列番号 353 のアミノ酸配列を含む、上記抗体又はその抗原結合フラグメント。

## 【請求項 11】

重鎖及び軽鎖を含む請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントであって、ここで軽鎖は配列番号 354 のアミノ酸配列を含む、上記抗体又はその抗原結合フラグメント。

## 【請求項 12】

配列番号 353 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び、配列番号 354 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体である、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

## 【請求項 13】

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の C5 に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント及び薬学的に許容しうる担体又は希釈剤を含む、医薬組成物。

## 【請求項 14】

C5 に関連する疾患又は障害の少なくとも 1 つの症状又は徴候を予防するか、処置するか又は寛解させるための医薬組成物であって、それを必要とする被験体に対する治療有効量の請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物。

## 【請求項 15】

疾患又は障害は、非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS)、発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH)、加齢性黄斑変性、地図状萎縮、ぶどう膜炎、視神経脊髄炎、多発性硬化症、脳卒中、ギラン・バレー症候群、外傷性脳損傷、パーキンソン病、不適切又は望ましくない補体活性化の障害、血液透析合併症、超急性同種移植片拒絶、異種移植片拒絶、IL-2 治療の間のインターロイキン-2 誘導毒性、炎症性障害、自己免疫疾患の炎症、クローン病、成人呼吸促迫症候群、熱傷、火傷、凍傷、虚血後再灌流状態、心筋梗塞、毛細管漏出症候群、肥満、糖尿病、アルツハイマー病、統合失調症、脳卒中、てんかん、アテローム性動脈硬化、血管炎、水疱性類天疱瘡、C3 腎症、膜増殖性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、アルポート症候群、進行性腎不全、蛋白尿性腎臓病、腎虚血-再灌流傷害、ループス腎炎、バルーン血管形成術、心肺バイパス術又は腎動脈バイパス術におけるポンプ後症候群、血液透析、腎虚血、大動脈再建後の腸間膜動脈再灌流、感染性疾患、敗血症、免疫複合体病、自己免疫疾患、腎障害、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス (SLE)、ループス腎炎、増殖性腎炎、溶血性貧血、喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、肺気腫、肺塞栓症、肺梗塞、肺炎、並びに重症筋無力症からなる群より選択される、請求項 14 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 16】

疾患又は障害が非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) である、請求項 14 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 17】

疾患又は障害が発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) である、請求項 14 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 18】

医薬組成物は、それを必要とする被験体に予防的に投与される、請求項 14 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

**【請求項 19】**

医薬組成物は、第二の治療剤と組み合わせて投与される、請求項 14 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 20】**

第二の治療剤は、抗凝固薬、抗炎症薬、降圧薬、免疫抑制剤、脂質低下剤、抗 CD20 薬、リツキシマブ、抗 TNF 薬、インフリキシマブ、抗癌薬、C3 阻害剤、第二の抗 C5 抗体、及び抗血栓薬からなる群より選択される、請求項 19 に記載の医薬組成物。

**【請求項 21】**

医薬組成物は、皮下、又は静脈内投与されるためのものである、請求項 14 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

10

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本出願は 2017 年 6 月 13 日に PCT 国際特許出願として出願され、そして米国仮出願第 62/349,705 号 (2016 年 6 月 14 日出願) ; 同第 62/405,561 号 (2016 年 10 月 7 日) ; 及び同第 62/422,107 号 (2016 年 11 月 15 日) (それぞれの開示はそれら全体として参照により本明細書に加入される) に対して優先権の利益を主張する。

**【0002】**

発明の分野

20

本発明は、補体因子 C5 に特異的に結合する抗体及び抗体の抗原結合フラグメント、並びにそれらの抗体を使用する治療方法及び診断方法に関する。

**【背景技術】****【0003】**

発明の背景

補体系は、活性化された場合に標的細胞溶解をもたらし、そしてオプソニン化によりファゴサイトーシスを促進する一群の血漿タンパク質である。補体は 3 つの主要な経路による一連のタンパク質溶解工程により活性化される : 古典的経路、これは典型的には免疫複合体により活性化される、無保護細胞表面により誘導され得る代替経路、及びマンノース結合レクチン経路。補体カスケードの 3 つの経路全てが補体成分 5 (C5) タンパク質のタンパク質分解切断に収束する。補体成分 5 (C5) の切断は、補体カスケードの活性化の間の重大なプロセスであるフラグメント C5a 及び C5b の生成をもたらす。C5a はその受容体を通して多面的な生理学的応答を生じ得る (非特許文献 1)。C5a は走化性移動を誘導する強力な炎症促進性メディエータであり、細胞接着を増強し、酸化的バーストを刺激し、そしてヒスタミン又はサイトカインのような様々な炎症メディエータの放出を誘導する。C5b は膜侵襲複合体 (MAC、又は C5b-9) の形成を媒介し、補体依存性細胞障害 (CDC) の後期に細胞溶解をもたらす。さらに、C5b-9 による細胞溶解に抵抗性である有核細胞において、半溶解的な (sublytic) 量の C5b-9 は、細胞活性化を引き起こし得、これが細胞増殖、炎症促進性メディエータの生成及び細胞外マトリクスの産生を生じる。

30

40

**【0004】**

C5 に対するモノクローナル抗体は当該分野で公知であり、例えば特許文献 1、特許文献 2、特許文献 3、特許文献 4、特許文献 5、特許文献 6、特許文献 7、特許文献 8、特許文献 9、特許文献 10、特許文献 11、特許文献 12、特許文献 13、特許文献 14、特許文献 15、特許文献 16、特許文献 17、特許文献 18、特許文献 19、特許文献 20、特許文献 21、並びに特許文献 22、特許文献 23、特許文献 24、特許文献 25、特許文献 26、及び特許文献 27 に記載されている。

**【先行技術文献】****【特許文献】****【0005】**

50

【文献】米国特許第 9 2 0 6 2 5 1 号

米国特許第 9 1 0 7 8 6 1 号

米国特許第 9 0 7 9 9 4 9 号

米国特許第 9 0 5 1 3 6 5 号

米国特許第 8 9 9 9 3 4 0 号

米国特許第 8 8 8 3 1 5 8 号

米国特許第 8 2 4 1 6 2 8 号

米国特許第 7 9 9 9 0 8 1 号

米国特許第 7 4 3 2 3 5 6 号

米国特許第 7 3 6 1 3 3 9 号

米国特許第 7 2 7 9 1 5 8 号

米国特許第 6 5 3 4 0 5 8 号

米国特許第 6 3 5 5 2 4 5 号

米国特許第 6 0 7 4 6 4 2 号

米国特許公開第 2 0 1 6 0 2 9 9 3 0 5 号

米国特許公開第 2 0 1 6 0 0 5 1 6 7 3 号

米国特許公開第 2 0 1 6 0 0 3 1 9 7 5 号

米国特許公開第 2 0 1 5 0 1 5 8 9 3 6 号

米国特許公開第 2 0 1 4 0 0 5 6 8 8 8 号

米国特許公開第 2 0 1 3 0 0 2 2 6 1 5 号

米国特許公開第 2 0 1 2 0 3 0 8 5 5 9 号

WO 2 0 1 5 1 9 8 2 4 3

WO 2 0 1 5 1 3 4 8 9 4

WO 2 0 1 5 1 2 0 1 3 0

EP 2 5 6 3 8 1 3 B 1

EP 2 3 2 8 6 1 6 B 1

EP 2 0 6 1 8 1 0 B 1

【非特許文献】

【0006】

【文献】Monk et al 2007, Br. J. Pharmacol. 152: 42

9 - 448

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

高い親和性で C5 タンパク質に特異的に結合し、かつ改善された薬物動態特性を有する完全ヒト抗体は、様々な C5 関連疾患（例えば、非典型溶血性尿毒症症候群）の予防及び処置において重要であり得る。

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明の簡単な要旨

本発明は、補体因子 5（C5）タンパク質に特異的に結合する抗体及びその抗原結合フラグメントを提供する。本発明の抗体は、とりわけ、C5 タンパク質の活性を阻害又は中和するために有用である。特定の実施態様において、抗体は、被験体において C5 関連疾患又は障害の少なくとも 1 つの症状又は徴候を予防するか、処置するか又は寛解させる際に有用である。特定の実施態様において、抗体は、C5 関連疾患又は障害を有するか又は有する危険性のある被験体に予防的又は治療的に投与され得る。特定の実施態様において、抗 C5 抗体は、高い親和性で C5 に結合し、かつ改善された薬物動態（PK）及び薬力学（PD）特性を有する完全ヒト抗体である。このような改善された PK / PD を有する高親和性抗体は、C5 関連疾患又は障害を有する被験体においてより少ない頻度の投薬とともに、優れた有効性を提供するために使用され得る。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 9 】

本発明の抗体は全長（例えば、I g G 1 又は I g G 4 抗体）であっても、抗原結合部分（例えば、F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub> 又は s c F v フラグメント）のみを含んでいてもよく、そして機能に影響を及ぼすため、例えば、宿主における持続性を増加させるため、又は残留エフェクター機能を除外するために改変されてもよい（R e d d y e t a l . , 2 0 0 0 , J . I m m u n o l . 1 6 4 : 1 9 2 5 - 1 9 3 3 ）。特定の実施態様において、抗体は二重特異性であってもよい。

## 【 0 0 1 0 】

第一の局面において、本発明は、C 5 タンパク質に特異的に結合する単離された組み換えモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。いくつかの実施態様において、抗体は完全ヒトモノクローナル抗体である。

10

## 【 0 0 1 1 】

本発明の例となる抗 C 5 抗体は、本明細書の表 1 及び 2 に列挙される。表 1 は、例となる抗 C 5 抗体の、重鎖可変領域（H C V R）、軽鎖可変領域（L C V R）、重鎖相補性決定領域（H C D R 1、H C D R 2 及び H C D R 3）、及び軽鎖相補性決定領域（L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3）のアミノ酸配列識別子を示す。表 2 は、例となる抗 C 5 抗体の H C V R、L C V R、H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 の核酸配列識別子を示す。

## 【 0 0 1 2 】

本発明は、表 1 に列挙される H C V R アミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % 又は少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む H C V R を含む、抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。

20

## 【 0 0 1 3 】

本発明はまた、表 1 に列挙される L C V R アミノ酸配列又はそれに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % 又は少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む L C V R を含む、抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。

## 【 0 0 1 4 】

本発明はまた、表 1 に列挙される L C V R アミノ酸配列のいずれかと対になった表 1 に列挙される H C V R アミノ酸配列のいずれかを含む H C V R 及び L C V R アミノ酸配列対（H C V R / L C V R）を含む、抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。特定の実施態様によれば、本発明は、表 1 に列挙される例となる抗 C 5 抗体のいずれか内に含有される H C V R / L C V R アミノ酸配列対を含む、抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。特定の実施態様において、H C V R / L C V R アミノ酸配列対は、配列番号 2 / 1 0、1 8 / 2 6、3 4 / 4 2、5 0 / 5 8、6 6 / 7 4、8 2 / 9 0、9 8 / 1 0 6、9 8 / 1 1 4、1 2 2 / 1 0 6、9 8 / 1 3 0、1 3 8 / 1 0 6、1 4 6 / 1 0 6、1 2 2 / 1 3 0、1 4 6 / 1 1 4、1 4 6 / 1 3 0、1 3 8 / 1 3 0、1 5 4 / 1 6 2、1 7 0 / 1 7 8、1 8 6 / 1 9 4、2 0 2 / 2 1 0、2 1 8 / 2 2 6、2 3 4 / 2 4 2、2 5 0 / 2 5 8、2 6 6 / 2 5 8、2 7 4 / 2 8 2、2 9 0 / 2 9 8、3 0 6 / 3 1 4、3 2 2 / 3 3 0、及び 3 3 8 / 3 4 6 からなる群より選択される。特定の実施態様において、H C V R / L C V R アミノ酸配列対は、配列番号 5 0 / 5 8（例えば、H 4 H 1 2 1 6 1 P）、9 8 / 1 0 6（例えば、H 4 H 1 2 1 6 6 P）、1 3 8 / 1 0 6（例えば、H 4 H 1 2 1 6 6 P 5）、又は 2 0 2 / 2 1 0（例えば、H 4 H 1 2 1 7 0 P）のうちの 1 つから選択される。特定の実施態様において、本発明は H C V R 及び L C V R を含む抗 C 5 抗体又はその抗原結合フラグメントを提供し、該 H C V R は 5 以下のアミノ酸置換を有する表 1 に列挙されるアミノ酸配列を含み、そして該 L C V R は 2 以下のアミノ酸置換を有する表 1 に列挙されるアミノ酸配列を含む。例えば、本発明は、H C V R 及び L C V R を含む抗 C 5 抗体又はその抗原結合フラグメントを提供し、該 H C V R は 5 以下のアミノ酸置換を有する配列番号 9 8 のアミノ酸配列を含み、そして該 L C V R は 2 以下のアミノ酸置

30

40

50

換を有する配列番号 106 のアミノ酸配列を含む。別の実施態様において、本発明は、H C V R 及び L C V R を含む抗 C 5 抗体又はその抗原結合フラグメントを提供し、該 H C V R は少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有する配列番号 98 のアミノ酸配列を含み、そして該 L C V R は 1 つのアミノ酸置換を有する配列番号 106 のアミノ酸配列を含む。

【0015】

本発明はまた、表 1 に列挙される H C D R 1 アミノ酸配列のいずれか又は少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1 ( H C D R 1 ) を含む抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。

【0016】

本発明はまた、表 1 に列挙される H C D R 2 アミノ酸配列のいずれか又は少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2 ( H C D R 2 ) を含む抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。

【0017】

本発明はまた、表 1 に列挙される H C D R 3 アミノ酸配列のいずれか又は少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3 ( H C D R 3 ) を含む抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。

【0018】

本発明はまた、表 1 に列挙される L C D R 1 アミノ酸配列のいずれか又は少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 1 ( L C D R 1 ) を含む抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。

【0019】

本発明はまた、表 1 に列挙される L C D R 2 アミノ酸配列のいずれか又は少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 2 ( L C D R 2 ) を含む抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。

【0020】

本発明はまた、表 1 に列挙される L C D R 3 アミノ酸配列のいずれか又は少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列を含む軽鎖 C D R 3 ( L C D R 3 ) を含む抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。

【0021】

本発明はまた、表 1 に列挙される L C D R 3 アミノ酸配列のいずれかと対になった表 1 に列挙される H C D R 3 アミノ酸配列のいずれかを含む H C D R 3 及び L C D R 3 アミノ酸対 ( H C D R 3 / L C D R 3 ) を含む抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。特定の実施態様によれば、本発明は、表 1 に列挙される例となる抗 C 5 抗体のいずれか内に含有される H C D R 3 / L C D R 3 アミノ酸配列対を含む抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。特定の実施態様において、H C D R 3 / L C D R 3 アミノ酸配列対は、配列番号 56 / 64 (例えば、H 4 H 1 2 1 6 1 P)、104 / 112 (例えば、H 4 H 1 2 1 6 6 P)、144 / 112 (例えば、H 4 H 1 2 1 6 6 P 5)、及び 208 / 216 (例えば、H 4 H 1 2 1 7 0 P) からなる群より選択される。

【0022】

本発明はまた、H C V R 及び L C V R を含む抗体又はその抗原結合フラグメントを提供し、該 H C V R は、表 1 に列挙されるアミノ酸配列と 1 アミノ酸異なるアミノ酸配列を含む H C D R 1、表 1 に列挙されるアミノ酸配列と 1 アミノ酸異なるアミノ酸配列を含む H C D R 2、及び表 1 に列挙されるアミノ酸配列と 1 アミノ酸異なるアミノ酸配列を含む H C D R 3 を含む。特定の実施態様において、本発明は、H C V R 及び L C V R を含む抗体又

10

20

30

40

50

は抗原結合フラグメントを提供し、該LCVRは、表1に列挙されるアミノ酸配列と1アミノ酸異なるアミノ酸配列を含むLCDR1、表1に列挙されるアミノ酸配列と1アミノ酸異なるアミノ酸配列を含むLCDR2、及び表1に列挙されるアミノ酸配列と1アミノ酸異なるアミノ酸配列を含むLCDR3を含む。例えば、本発明は、HCVR及びLCVRを含む抗C5抗体又はその抗原結合フラグメントを提供し、該HCVRは、配列番号100のアミノ酸配列又は配列番号100と1アミノ酸異なるアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号102のアミノ酸配列又は配列番号102と1アミノ酸異なるアミノ酸配列を含むHCDR2、及び配列番号104のアミノ酸配列又は配列番号104と1アミノ酸異なるアミノ酸配列を含むHCDR3を含む。別の例となる実施態様において、本発明は、HCVR及びLCVRを含む抗体又はその抗原結合フラグメントを提供し、該LCVRは、配列番号108のアミノ酸配列又は配列番号108と1アミノ酸異なるアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号110のアミノ酸配列又は配列番号110と1アミノ酸異なるアミノ酸配列を含むLCDR2、及び配列番号112のアミノ酸配列又は配列番号112と1アミノ酸異なるアミノ酸配列を含むLCDR3を含む。

10

#### 【0023】

本発明は、配列番号353のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する実質的に類似した配列を含む重鎖を含む抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。

#### 【0024】

本発明はまた、配列番号354のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する実質的に類似した配列を含む軽鎖を含む抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。

20

#### 【0025】

特定の実施態様において、本発明は、配列番号353のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも80%、もしくは少なくとも90%の配列同一性を有する実質的に類似した配列を含む重鎖；及び配列番号354のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも80%、もしくは少なくとも90%の配列同一性を有する実質的に類似した配列を含む軽鎖を含む抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。

30

#### 【0026】

本発明はまた、表1に列挙される例となる抗C5抗体のいずれか内に含有される6つのCDRのセット(すなわち、HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)を含む抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。特定の実施態様において、HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3アミノ酸配列セットは、配列番号52-54-56-60-62-64(例えば、H4H12161P)、100-102-104-108-110-112(例えば、H4H12166P)、140-142-144-108-110-112(例えば、H4H12166P5)、及び204-206-208-212-214-216(例えば、H4H12170P)からなる群より選択される。

40

#### 【0027】

関連する実施態様において、本発明は、表1に列挙される例となる抗C5抗体のいずれかにより定義されるHCVR/LCVRアミノ酸配列対内に含有される6つのCDRのセット(すなわち、HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)を含む抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。例えば、本発明は、配列番号50/58(例えば、H4H12161P)、98/106(例えば、H4H12166P)、138/106(例えば、H4H12166P5)、又は202/210(例えば、H4H12170P)からなる群より選択されるHCVR/LCVRアミノ酸配列対内に含有されるHCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3アミノ酸配列セットを含む抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。HCVR及び

50



LCVR アミノ酸配列内のCDRを同定するための方法及び技術は当該分野で周知であり、そして本明細書に開示される特定のHCVR及び/又はLCVRアミノ酸配列内のCDRを同定するために使用され得る。CDRの境界を同定するために使用され得る例となる慣例としては、例えば、Kabata定義、Chothia定義、及びAbM定義が挙げられる。一般的には、Kabata定義は配列可変性に基づき、Chothia定義は構造的ループ領域の位置に基づき、そしてAbM定義はKabata及びChothiaアプローチの間の折衷である。例えば、Kabata、「Sequences of Protein  
s of Immunological Interest,」National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273: 927-948 (1997); 及びMartin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9268-9272 (1989)を参照のこと。公開データベースも抗体内のCDR配列を同定するために利用可能である。

10

#### 【0028】

特定の実施態様において、本発明は、C5に特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、ここで抗体又はその抗原結合フラグメントは、重鎖可変領域(HCVR)内に含有される3つの重鎖相補性決定領域(CDR)(HCDR1、HCDR2及びHCDR3)及び軽鎖可変領域(LCVR)内に含有される3つの軽鎖CDR(LCDR1、LCDR2及びLCDR3)を含み、ここでHCVRは：(i)配列番号98のアミノ酸配列、(ii)配列番号98に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列、(iii)配列番号98に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列；又は(iv)5以下のアミノ酸置換を有する配列番号98のアミノ酸配列を含み；そしてLCVRは：(i)配列番号106のアミノ酸配列、(ii)配列番号106に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列、(iii)配列番号106に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列；又は(iv)5以下のアミノ酸置換を有する配列番号106のアミノ酸配列を含む。

20

#### 【0029】

本発明は、改変されたグリコシル化パターンを有する抗C5抗体を含む。いくつかの実施態様において、望ましくないグリコシル化部位を除去する改変、例えば抗体依存性細胞傷害(ADCC)機能を増加させるための、オリゴ糖鎖上に存在するフコース部分を欠いた抗体は有用であり得る(Shield et al., (2002) JBC 277: 26733を参照のこと)。他の適用において、ガラクトシル化の改変が補体依存性細胞障害(CDC)を改変するために行われ得る。

30

#### 【0030】

特定の実施態様において、本発明は、C5に対するpH依存性結合を示す抗体及びその抗原結合フラグメントを提供する。例えば、本発明は、酸性pHよりも中性pHでより高い親和性でC5に結合する(すなわち、酸性pHで減少した結合)抗体及びその抗原結合フラグメントを含む。

#### 【0031】

特定の実施態様において、本発明は、改善された薬物動態及び薬力学特性を示す抗体及び抗原結合フラグメントを提供し、例えば、本発明は、延長された血清半減期を有する抗C5抗体を提供する。特定の実施態様において、本発明の抗C5抗体は、C5ヒト化マウスにおいて40日目まで10µg/mLより高い血清濃度を有する。特定の実施態様において、本発明の抗C5抗体は、C5ヒト化マウスへの投与の際に、35日目までCP溶血及びAP溶血を遮断する。

40

#### 【0032】

本発明はまた、HCVRのCDR及びLCVRのCDRを含む抗体又はその抗原結合フラグメントとC5に対する特異的結合について競合する抗体及びその抗原結合フラグメントを提供し、ここでHCVR及びLCVRはそれぞれ、表1に列挙されるHCVR及びLCVR配列から選択されるアミノ酸配列を有する。

50

## 【 0 0 3 3 】

本発明はまた、H C V RのC D R及びL C V RのC D Rを含む参照抗体又はその抗原結合フラグメントとC 5に対する結合について交差競合する抗体及びその抗原結合フラグメントを提供し、ここでH C V R及びL C V Rはそれぞれ、表 1 に列挙されるH C V R及びL C V R配列から選択されるアミノ酸配列を有する。

## 【 0 0 3 4 】

本発明はまた、H C V RのC D R及びL C V RのC D Rを含む参照抗体又はその抗原結合フラグメントと同じエピトープに結合する抗体及びその抗原結合フラグメントを提供し、ここでH C V R及びL C V Rはそれぞれ、表 1 に列挙されるH C V R及びL C V R配列から選択されるアミノ酸配列を有する。特定の実施態様において、本発明は、H C V RのC D R及びL C V RのC D Rを含む参照抗体又はその抗原結合フラグメントと同じエピトープに結合する抗体及びその抗原結合フラグメントを提供し、ここでH C V R / L C V Rアミノ酸配列対は配列番号 9 8 / 1 0 6 を有する。

10

## 【 0 0 3 5 】

本発明はまた、C 5 のアルファ鎖及び / 又はベータ鎖に含まれる 1 つ又はそれ以上のアミノ酸残基に結合する抗 C 5 抗体及びその抗原結合フラグメントを含む。特定の実施態様において、本発明は、C 5 のアルファ鎖中の 1 つ又はそれ以上のアミノ酸及びC 5 のベータ鎖中の 1 つ又はそれ以上のアミノ酸に結合する抗体及びその抗原結合フラグメントを提供する。特定の実施態様において、本発明は、C 5 のアルファ鎖及びベータ鎖中の 1 つ又はそれ以上のアミノ酸に結合する抗体及びその抗原結合フラグメントを提供し、ここで抗体はC 5 a アナフィラトキシンドメインに結合しない。特定の実施態様において、本発明は、ヒトC 5 (配列番号 3 5 9) 内に含有される 1 つ又はそれ以上のアミノ酸と相互作用する抗 C 5 抗体を提供する。特定の実施態様において、本発明は、ヒトC 5 (配列番号 3 5 9) 内に含有される 1 つ又はそれ以上のアミノ酸と相互作用する抗 C 5 抗体を提供し、ここで抗体は、C 5 のC 5 a アナフィラトキシンドメインに結合しない。特定の実施態様において、本発明は、( a ) 配列番号 3 5 9 のアミノ酸 5 9 1 ~ 5 9 9 ; ( b ) 配列番号 3 5 9 のアミノ酸 5 9 3 ~ 5 9 9 ; ( c ) 配列番号 3 5 9 のアミノ酸 7 7 5 ~ 7 8 7 ; ( d ) 配列番号 3 5 9 のアミノ酸 7 7 5 ~ 7 9 4 ; 及び ( e ) 配列番号 3 5 9 のアミノ酸 7 7 9 ~ 7 8 7 からなる群より選択されるアミノ酸配列と相互作用する抗 C 5 抗体及びその抗原結合フラグメントを提供する。特定の実施態様において、本発明は、配列番号 3 5 9 内に含有される 1 つ又はそれ以上のアミノ酸と相互作用する抗 C 5 抗体及びその抗原結合フラグメントを提供し、例えば、本発明は、配列番号 3 6 1 内に含有される少なくとも 5 つのアミノ酸、少なくとも 1 0 のアミノ酸、又は少なくとも 1 5 のアミノ酸と相互作用する抗 C 5 抗体及びその抗原結合フラグメントを提供する。特定の実施態様において、本発明は、配列番号 3 5 9 内に含有される 1 つ又はそれ以上のアミノ酸と相互作用する抗 C 5 抗体及びその抗原結合フラグメントを提供し、例えば、本発明は、配列番号 3 6 0 内に含有される少なくとも 5 つのアミノ酸と相互作用する抗 C 5 抗体及びその抗原結合フラグメントを提供する。特定の実施態様において、本発明は、配列番号 3 6 0 及び 3 6 1 内に含有される少なくとも 5 つのアミノ酸と相互作用する抗 C 5 抗体及びその抗原結合フラグメントを提供する。特定の実施態様において、本発明は、配列番号 3 6 0 のアミノ酸配列 (配列番号 3 5 9 のアミノ酸 5 9 1 ~ 5 9 9 に対応する) 及び配列番号 3 6 1 のアミノ酸配列 (配列番号 3 5 9 のアミノ酸 7 7 5 ~ 7 9 4 に対応する) と相互作用する抗 C 5 抗体及びその抗原結合フラグメントを提供する。

20

30

40

## 【 0 0 3 6 】

いくつかの実施態様において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、アゴニスト様式でC 5 に特異的に結合し得、すなわち、C 5 結合及び / 又は活性を増強又は刺激し得 ; 他の実施態様では、抗体はアンタゴニスト様式でC 5 に特異的に結合し得、すなわち、C 5 結合及び / 又は活性を遮断し得る。

## 【 0 0 3 7 】

本発明はまた、C 5 転換酵素へのC 5 の結合を遮断する単離された抗体及びその抗原結合

50

フラグメントを提供する。いくつかの実施態様において、C 5 転換酵素への C 5 の結合を遮断する抗体又はその抗原結合フラグメントは、C 5 転換酵素と同じ C 5 上のエピトープに結合し得るか、又は C 5 転換酵素と異なる C 5 上のエピトープに結合し得る。いくつかの実施態様において、本発明は、サル C 5 転換酵素への C 5 の結合を遮断する抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。

#### 【 0 0 3 8 】

特定の実施態様において、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントは、C 5 タンパク質の第一のエピトープに対する第一の結合特異性及び C 5 タンパク質の第二のエピトープに対する第二の特異性を含む二重特異性であり、ここで第一及び第二のエピトープは異なり、かつ重ならない。

#### 【 0 0 3 9 】

特定の実施態様において、本発明の抗体及び抗原結合フラグメントは、C 5 a に対して 0 . 5 n M 未満の  $IC_{50}$  で結合する。特定の実施態様において、抗体は、配列番号 2 9 0、3 0 6、3 2 2、及び 3 3 8 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む H C V R を含む。特定の実施態様において、抗体は、配列番号 2 9 8、3 1 4、3 3 0、及び 3 4 6 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む L C V R を含む。

#### 【 0 0 4 0 】

特定の実施態様において、本発明は、以下の 1 つ又はそれ以上を有する単離された抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する：( a ) 完全ヒトモノクローナル抗体である；( b ) 表面プラズモン共鳴で測定して、2 5 で 0 . 9 n M 未満の解離定数 (  $K_D$  ) でヒト C 5 に結合する；( c ) 表面プラズモン共鳴アッセイで測定して、3 7 で 0 . 3 n M 未満の  $K_D$  でヒト C 5 に結合する；( d ) 表面プラズモン共鳴アッセイで測定して、6 5 n M 未満の  $K_D$  でサル C 5 に結合する；( e ) 表面プラズモン共鳴アッセイで測定して、0 . 5 n M 未満の  $K_D$  でヒト C 5 変異体 R 8 8 5 H ( 配列番号 3 5 6 ) に結合する；( f ) 表面プラズモン共鳴アッセイで測定して、0 . 5 n M 未満の  $K_D$  でヒト C 5 変異体 R 8 8 5 C ( 配列番号 3 5 7 ) に結合する；( g ) C P 溶血アッセイで測定して、6 n M 未満の  $IC_{50}$  で 9 5 % より多くヒト C 5 媒介古典的経路 ( C P ) 溶血を遮断する；( h ) A P 溶血アッセイで測定して、1 6 5 n M 未満の  $IC_{50}$  で 7 0 % より多くヒト C 5 媒介代替経路 ( A P ) 溶血を遮断する；( i ) C P 溶血アッセイで測定して、1 8 5 n M 未満の  $IC_{50}$  でアフリカミドリザル C 5 媒介 C P 溶血を阻害する；( j ) A P 溶血アッセイで測定して、2 3 5 n M 未満の  $IC_{50}$  でアフリカミドリザル C 5 媒介 A P 溶血を阻害する；( k ) C P 溶血アッセイで測定して、1 4 5 n M 未満の  $IC_{50}$  でカニクイザル C 5 媒介 C P 溶血を阻害する；及び ( l ) A P 溶血アッセイで測定して、3 0 n M 未満の  $IC_{50}$  でカニクイザル C 5 媒介 A P 溶血を阻害する。

#### 【 0 0 4 1 】

特定の実施態様において、本発明は、以下の特徴の 1 つ又はそれ以上を有する単離された組み換えモノクローナル抗 C 5 抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する：( a ) 配列番号 1 0 0 - 1 0 2 - 1 0 4 - 1 0 8 - 1 1 0 - 1 1 2 のアミノ酸配列を含む 6 つの C D R のセットを含む；( b ) 表面プラズモン共鳴アッセイで測定して、2 5 で 0 . 2 n M 未満の解離定数 (  $K_D$  ) でヒト C 5 に結合する；( c ) 表面プラズモン共鳴アッセイで測定して、3 7 で 0 . 3 n M 未満の  $K_D$  でヒト C 5 に結合する；( d ) 表面プラズモン共鳴アッセイで測定して、3 7 で 0 . 4 n M 未満の  $K_D$  でヒト C 5 変異体 ( R 8 8 5 H ) に結合する；( e ) 3 n M 未満の  $IC_{50}$  でヒト血清の古典経路 ( C P ) 媒介溶血を阻害する；( f ) 2 7 n M 未満の  $IC_{50}$  でヒト血清の代替経路 ( A P ) 媒介溶血を阻害する；( g ) 2 1 n M 未満の  $IC_{50}$  でサル血清の C P 媒介溶血を阻害する；( g ) 1 0 n M 未満の  $IC_{50}$  でサル血清の A P 媒介溶血を阻害する；( h ) C 5 ヒト化マウスにおいて 1 0 日より長い血清半減期 (  $t_{1/2}$  ) を有する；( i ) C 5 ヒト化マウスに投与する際に 4 0 日目まで 1 0  $\mu$  g / m L より高い血清濃度を有する；( j ) C 5 ヒト化マウスにおいて 5 0 日まで C P 媒介溶血を遮断する；並びに ( k ) 配列番号 3 5 9 のアルファ鎖及び / 又はベータ鎖に含まれる 1 つ又はそれ以上のアミノ酸に結合し、ここで抗体は C 5 の

10

20

30

40

50

C 5 a アナフィラトキシンドメインに結合しない。

【 0 0 4 2 】

第二の局面において、本発明は、抗 C 5 抗体又はその部分をコードする核酸分子を提供する。例えば、本発明は、表 1 に列挙される H C V R アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子を提供し；特定の実施態様において、核酸分子は、表 2 に列挙される H C V R 核酸配列のいずれか、又はそれらに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 4 3 】

本発明はまた、表 1 に列挙される L C V R アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子を提供し；特定の実施態様において、核酸分子は、表 2 に列挙される L C V R 核酸配列、又はそれらに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

10

【 0 0 4 4 】

本発明はまた、表 1 に列挙される H C D R 1 アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子を提供し；特定の実施態様において、核酸分子は、表 2 に列挙される H C D R 1 核酸配列、又はそれらに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

20

【 0 0 4 5 】

本発明はまた、表 1 に列挙される H C D R 2 アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子を提供し；特定の実施態様において、核酸分子は、表 2 に列挙される H C D R 2 核酸配列、又はそれらに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 4 6 】

本発明はまた、表 1 に列挙される H C D R 3 アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子を提供し；特定の実施態様において、核酸分子は、表 2 に列挙される H C D R 3 核酸配列、又はそれらに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

30

【 0 0 4 7 】

本発明はまた、表 1 に列挙される L C D R 1 アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子を提供し；特定の実施態様において、核酸分子は、表 2 に列挙される L C D R 1 核酸配列、又はそれらに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 4 8 】

本発明はまた、表 1 に列挙される L C D R 2 アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子を提供し；特定の実施態様において、核酸分子は、表 2 に列挙される L C D R 2 核酸配列、又はそれらに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

40

【 0 0 4 9 】

本発明はまた、表 1 に列挙される L C D R 3 アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子を提供し；特定の実施態様において、核酸分子は、表 2 に列挙される L C D R 3 核酸配列、又はそれらに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

50

## 【 0 0 5 0 】

本発明はまた H C V R をコードする核酸分子を提供し、ここで H C V R は、3つの C D R のセット（すなわち、H C D R 1 - H C D R 2 - H C D R 3）を含み、ここで H C D R 1 - H C D R 2 - H C D R 3 アミノ酸配列セットは、表 1 に列挙される例となる抗 C 5 抗体のいずれかにより定義されるとおりである。

## 【 0 0 5 1 】

本発明はまた L C V R をコードする核酸分子を提供し、ここで L C V R は、3つの C D R のセット（すなわち、L C D R 1 - L C D R 2 - L C D R 3）を含み、ここで L C D R 1 - L C D R 2 - L C D R 3 アミノ酸配列セットは、表 1 に列挙される例となる抗 C 5 抗体のいずれかにより定義されるとおりである。

10

## 【 0 0 5 2 】

本発明はまた H C V R 及び L C V R の両方をコードする核酸分子を提供し、ここで H C V R は、表 1 に列挙される H C V R アミノ酸配列のいずれかのアミノ酸配列を含み、そしてここで L C V R は、表 1 に列挙される L C V R アミノ酸配列のいずれかのアミノ酸配列を含む。特定の実施態様において、核酸分子は、表 2 に列挙される H C V R 核酸配列、又はそれに対して少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列、及び表 1 に列挙される L C V R 核酸配列、又はそれに対して少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列を含む。本発明のこの局面に従う特定の実施態様において、核酸分子は H C V R 及び L C V R をコードし、ここで H C V R 及び L C V R は、両方とも表 1 に列挙される同じ抗 C 5 抗体から誘導される。

20

## 【 0 0 5 3 】

関連する局面において、本発明は、抗 C 5 抗体の重鎖または軽鎖可変領域を含むポリペプチドを発現することができる組み換え発現ベクターを提供する。例えば、本発明は、上述の核酸分子のいずれか、すなわち、表 2 に示される H C V R、L C V R、及び / 又は C D R 配列のいずれかをコードする核酸分子を含む組み換え発現ベクターを含む。このようなベクターがその細胞中に導入されている宿主細胞、さらには宿主細胞を抗体又は抗体フラグメントの産生を可能にする条件下で宿主細胞を培養すること、並びにこのようにして産生された抗体及び抗体フラグメントを回収することにより抗体又はその一部を製造する方法もまた本発明の範囲内に包含される。

30

## 【 0 0 5 4 】

第三の局面において、本発明は、治療有効量の、C 5 に特異的に結合する少なくとも 1 つの組み換えモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント、及び薬学的に許容しうる担体を含む医薬組成物を提供する。関連する局面において、本発明は、抗 C 5 抗体と第二の治療剤との組み合わせである組成物を特徴とする。一実施態様において、第二の治療剤は、抗 C 5 抗体と有利に組み合わせられるいずれかの薬剤である。抗 C 5 抗体と有利に組み合わせられ得る例となる薬剤としては、限定することなく、C 5 活性に結合し、かつ / もしくは阻害する他の薬剤（他の抗体又はその抗原結合フラグメントなどを含む）及び / 又は C 5 に直接結合しないが、それにもかかわらず C 5 関連疾患もしくは障害の少なくとも 1 つの症状もしくは徴候を処置もしくは寛解する薬剤が挙げられる。本発明の抗 C 5 抗体を含むさらなる組み合わせ治療及び同時処方（c o - f o r m u l a t i o n s）は本明細書の他所に開示される。

40

## 【 0 0 5 5 】

第四の局面において、本発明は、本発明の抗 C 5 抗体又は抗体の抗原結合部分を使用して被験体において C 5 に関連する疾患又は障害を処置するための治療方法を提供し、ここで治療方法は、治療有効量の、本発明の抗体又は抗体の抗原結合フラグメントを含む医薬組成物をそれを必要とする被験体に投与することを含む。処置される障害は、C 5 活性の阻害により改善されるか、寛解されるか、阻害されるか又は予防されるいずれかの疾患又は

50

状態である。特定の実施態様において、本発明は、非典型溶血性尿毒症症候群（aHUS）の少なくとも1つの症状を予防するか、処置するか又は寛解させる方法を提供し、該方法は、治療有効量の本発明の抗C5抗体又はその抗原結合フラグメントをそれを必要とする被験体に投与することを含む。いくつかの実施態様において、本発明は、本発明の抗C5抗体を投与することにより、被験体において発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）の少なくとも1つの症状又は徴候を寛解させるか又は重症度を減少させる方法を提供する。いくつかの実施態様において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、C5関連疾患又は障害を有するか又はそれを有する危険性のある被験体に予防的又は治療的に投与され得る。特定の実施態様において、本発明の抗体又はその抗原結合フラグメントは、第二の治療剤と組み合わせてそれを必要とする被験体に投与される。第二の治療剤は、抗炎症薬（例えば、コルチコステロイド類、及び非ステロイド性抗炎症薬）、C5に対する異なる抗体、抗酸化剤のような栄養補助食品及び当該分野で公知のいずれかの他の薬物又は治療法からなる群より選択され得る。特定の実施態様において、第二の治療剤は、本発明の抗体又はその抗原結合フラグメントに関連するいずれかの可能な副作用を、そのような副作用が発生する場合に、対抗するか又は低減させるために役立つ薬剤でありえる。抗体又はそのフラグメントは、皮下、静脈内、皮内、腹腔内、経口又は筋内に投与され得る。抗体又はそのフラグメントは、被験体の約0.1mg/体重kgから約100mg/体重kgの用量で投与され得る。特定の実施態様において、本発明の抗体は、50mg～600mgの間を含む1又はそれ以上の用量で投与され得る。

10

【0056】

20

本発明はまた、C5の結合及び/又は活性の遮断から利益を得るであろう疾患又は障害の処置のための薬剤の製造における、本発明の抗C5抗体又はその抗原結合フラグメントの使用を含む。

【0057】

他の実施態様は、以下の詳細な説明の検討から明らかとなるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】図1は、ELISAにより決定した、抗C5抗体H4H12166Pの用量依存性様式でのC5aレベルの阻害を示す（本明細書の実施例9に記載される）。

【図2】図2は、雄性カニクイザルへのH4H12166P、H4H12161P、又は対照薬2の単回15mg/kg静脈内注射後の時間に対する総血清濃度を示す（本明細書の実施例10に記載される）。濃度-時間プロファイルを、該当する場合、定量限界未満（BLQ）結果後の最初の用量までプロットした（これは、LLOQ/2として補完された）。各データ点は平均（±SD）（n=4動物群）を表し；ADAにより影響を受けたとみなされる濃度は、それぞれ36日目及び29日目に開始したH4H12166P群における1匹の動物及びH4H12161P群における1匹の動物から除外された。LLOQ=定量下限。

30

【図3A】図3は、雄性カニクイザルへのH4H12166P、H4H12161P又は対照薬2の単回静脈内注射後の、エキスピボ赤血球（A）古典的経路及び（B）代替経路アッセイにおける時間に対する溶血パーセントを示す。両方の値からバックグラウンド溶解%を引いた、実験の溶解対最大溶解の比として計算された溶血%は、所定の時点で血清中に存在する特定の抗C5抗体により阻害されたC5の量に関連する。各データ点は平均（±SD）を表す。

40

【図3B】図3は、雄性カニクイザルへのH4H12166P、H4H12161P又は対照薬2の単回静脈内注射後の、エキスピボ赤血球（A）古典的経路及び（B）代替経路アッセイにおける時間に対する溶血パーセントを示す。両方の値からバックグラウンド溶解%を引いた、実験の溶解対最大溶解の比として計算された溶血%は、所定の時点で血清中に存在する特定の抗C5抗体により阻害されたC5の量に関連する。各データ点は平均（±SD）を表す。

【図4】図4は、C5についてヒト化されたマウスにおける選択された抗C5抗体の総血

50

清濃度対時間プロフィールを示す（本明細書の実施例 11 に記載される）。ヒト化 C5 マウスに、H4H12166P、対照薬 1 又は対照薬 2 の単回 15 mg / kg 皮下用量を投与した。各データ点は平均  $\pm$  s . e . m . （それぞれ n = 4 ~ 5 ）を表す。血清中の抗体濃度を、サンドイッチ E L I S A を使用して注射の 1、10、20、30 及び 40 日後にモニタリングした。

【図 5】図 5 は、C5 についてヒト化されたマウスにおける選択された抗 C5 抗体のエキスビボ補体古典的経路溶血アッセイにおける溶血パーセント対時間を示す。ヒト化 C5 マウスに、H4H12166P、対照薬 1 又は対照薬 2 の単回 15 mg / kg 皮下用量を投与した。各データ点は平均  $\pm$  s . e . m . （それぞれ n = 4 ~ 5 ）を表す。血清中の溶血パーセントを、投薬前、注射の 10、20、30、40 及び 50 日後にモニタリングした。両方の値からバックグラウンド溶解%を引いた、実験の溶解対最大溶解の比として計算された溶血%は、所定の時点で血清中に存在する特定の抗 C5 抗体により阻害された C5 の量に関連する。

10

【図 6】図 6 は、C5 についてヒト化されたマウスにおける選択された抗 C5 抗体の総血清濃度対時間プロフィールを示す（本明細書の実施例 11 に記載される）。マウスに H4H12166P、H4H12161P、対照薬 1 又は IgG4P アイソタイプコントロールの単回 15 mg / kg 皮下用量を投与した。各データ点は平均  $\pm$  s . e . m . （それぞれ n = 5 ）を表す。血清中の抗体レベルを、サンドイッチ E L I S A を使用して注射の 6 時間、1、2、3、4、7、10、14、21、30、45 及び 59 日後にモニタリングした。

20

【図 7】図 7 は、アイソタイプコントロール又は抗 C5 抗体 M1M17628N で 10 mg / kg 又は 50 mg / kg で処置されたマウスにおける光干渉断層撮影（OCT）スコアを示すグラフである（本明細書の実施例 14 に記載される）。\*\*\*\* p < 0 . 0001、両側 ANOVA 50 mg / kg での抗 C5 抗体での処置 対 未処置又はアイソタイプコントロールでの処置。

【図 8】図 8 は、C3 の存在しない場合（A）；及び 80  $\mu$  g / mL のヒト C3 の存在下（B）での抗 C5 抗体 M1M17628N による古典的経路溶血の阻害を示す（本明細書の実施例 14 に記載される）。

【図 9】図 9 は、アイソタイプコントロール又は抗ヒト C5 抗体 H4H12170P 10 mg / kg 又は 50 mg / kg で処置された C5 ヒト化マウスにおける細胞集団数を示す（本明細書の実施例 15 に記載される）。各群について n = 8 ~ 12 の眼。

30

【図 10】図 10 は、アイソタイプコントロール又は抗ヒト C5 抗体 H4H12170P 10 mg / kg 又は 50 mg / kg で処置された C5 ヒト化マウスにおける OCT スコアを示すグラフである（本明細書の実施例 15 に記載される）。各群について n = 8 ~ 12 の眼。

【図 11】図 11 は、アイソタイプコントロール、3 mg / kg 又は 10 mg / kg での抗ヒト C5 抗体 H4H12166P、又は対照薬 2 10 mg / kg で処置された C5 ヒト化マウスにおける OCT スコアを示すグラフである。各群について n = 6 ~ 12 の眼（本明細書の実施例 15 に記載される）。

【図 12】図 12 は、アイソタイプコントロール、抗ヒト C5 抗体 H4H12166P 3 mg / kg もしくは 10 mg / kg、又は対照薬 2 10 mg / kg で処置された C5 ヒト化マウスにおける細胞集団数を示す。各群について n = 6 ~ 12 の眼（本明細書の実施例 15 に記載される）。

40

【図 13】図 13 は、アイソタイプコントロール又は抗 C5 抗体 M1M17628N もしくは M1M17627N で処置された NZBWF1 マウスの生存曲線である（本明細書の実施例 17 に記載される）。

【図 14 A】図 14 は、アイソタイプコントロール又は抗 C5 抗体 M1M17628N もしくは M1M17627N で処置された NZBWF1 マウスにおける（A）尿中アルブミン及び（B）尿中クレアチニンに対して正規化された尿中アルブミンのレベルを示す（本明細書の実施例 17 に記載される）。

50

【図 1 4 B】図 1 4 は、アイソタイプコントロール又は抗 C 5 抗体 M 1 M 1 7 6 2 8 N もしくは M 1 M 1 7 6 2 7 N で処置された N Z B W F 1 マウスにおける ( A ) 尿中アルブミン及び ( B ) 尿中クレアチニンに対して正規化された尿中アルブミンのレベルを示す ( 本明細書の実施例 1 7 に記載される ) 。

【図 1 5】図 1 5 は、アイソタイプコントロール又は抗 C 5 抗体 M 1 M 1 7 6 2 8 N もしくは M 1 M 1 7 6 2 7 N ( 本明細書の実施例 1 7 に記載される ) で処置された N Z B W F 1 マウスにおける血中尿素窒素のレベルを示す。

【図 1 6】図 1 6 は、実施例 1 8 に記載されるように、抗 C 5 抗体 H 4 H 1 2 1 6 6 P、H 4 H 1 2 1 7 0 P、対照薬 1 及び対照薬 2 による星状膠細胞の抗体依存性細胞傷害の阻害を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 5 9 】

詳細な説明

本発明の方法を記載する前に、当然のことながら、記載される方法及び実験条件は変化し得るので、この発明は記載される特定の方法及び実験条件に限定されない。また当然のことながら、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるので、本明細書において使用される用語は、特定の実施態様を記載する目的のみのためであり、限定することを意図されない。

【 0 0 6 0 】

他の定義がなければ、本明細書において使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する分野の当業者により一般的に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載される方法及び材料と類似しているか又は等価であるいずれの方法及び材料も本発明の実施又は試験において使用され得るが、好ましい方法及び材料がここで記載される。本明細書において言及される全ての刊行物は、参照によりそれら全体として本明細書に加入される。

【 0 0 6 1 】

定義

「補体成分 5」又は「補体因子 5」とも呼ばれる用語「C 5」は、補体カスケードの血清タンパク質を指す。C 5 タンパク質は、2つの鎖アルファ及びベータを含む 1 6 7 6 アミノ酸タンパク質である。タンパク質は、3つの補体活性化経路の収束点を表す：古典的経路、代替経路及びマンノース結合レクチン経路。全長 C 5 タンパク質のアミノ酸配列は受け入れ番号 NP\_\_001726.2 (配列番号 355) として GenBank で提供されるアミノ酸配列により例示される。用語「C 5」は組み換え C 5 タンパク質又はそのフラグメントを含む。この用語はまた、例えば、ヒスチジンタグ、マウスもしくはヒト Fc、又は ROR1 のようなシグナル配列にカップリングした C 5 タンパク質又はそのフラグメントも包含する。例えば、この用語は、全長 C 5 タンパク質のアミノ酸残基 19 ~ 1676 にカップリングされた C 末端にヒスチジンタグを含む配列番号 356 又は 357 に示される配列により例示される配列を含む。この用語はまた、R885H 変化又は R885C 変化を有し、全長 C 5 タンパク質のアミノ酸残基 19 ~ 1676 にカップリングされた C 末端にヒスチジンタグを含むタンパク質変異体も含む。

【 0 0 6 2 】

本明細書で使用される用語「抗体」は、ジスルフィド結合により相互接続された 4 つのポリペプチド鎖、2 つの重 (H) 鎖及び 2 つの軽 (L) 鎖から構成される免疫グロブリン分子 (すなわち、「完全抗体分子」)、さらにはそれらの多量体 (例えば、IgM) 又はそれらの抗原結合フラグメントを指すことを意図される。各重鎖は、重鎖可変領域 (「HCV R」又は「VH」) 及び重鎖定常領域 (ドメイン CH1、CH2 及び CH3 から構成される) から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域 (「LCV R」又は「VL」) 及び軽鎖定常領域 (CL) から構成される。VH 及び VL 領域は、より保存されたフレームワーク領域 (FR) と呼ばれる領域に組み入れられた、相補性決定領域 (CDR) と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分され得る。各 VH 及び VL は、アミノ末端からカルボキシ末端

10

20

30

40

50



に以下の順序で配置された3つのCDR及び4つのFRから構成される：FR 1、CDR 1、FR 2、CDR 2、FR 3、CDR 3、FR 4。本発明の特定の実施態様において、抗体（又はその抗原結合フラグメント）のFRは、ヒト生殖系列配列と同一であり得、又は天然にもしくは人工的に改変され得る。アミノ酸コンセンサス配列は、2つ又はそれ以上のCDRの対照（side-by-side）解析に基づいて定義され得る。

【0063】

1つもしくはそれ以上のCDR残基の置換又は1つもしくはそれ以上のCDRの削除も可能である。1つ又は2つのCDRが結合のために省かれ得る抗体が科学文献に記載されている。Padlanら（1995 FASEB J. 9:133-139）は、公開された結晶構造に基づいて抗体とそれらの抗原との間の接触領域を解析し、そしてCDR残基のおよそ5分の1から3分の1のみが実際に抗原に接触すると結論づけた。Padlanはまた、1つ又は2つのCDRが抗原と接触するアミノ酸を有していない多くの抗体を発見した（Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320:415-428も参照のこと）。

10

【0064】

抗原と接触していないCDR残基は、分子モデリングにより及び/又は経験的にChothia CDRの外側にあるKabatt CDRの領域から、以前の研究に基づいて同定することができる（例えば、CDRH2における残基H60～H65はしばしば必要ない）。CDR又はその残基が削除される場合、それは通常、別のヒト抗体配列又はそのような配列のコンセンサスにおける対応する位置を占めるアミノ酸と置き換えられる。CDR内の置換の位置及び置換するべきアミノ酸もまた経験的に選択され得る。経験的置換は保存的置換でも非保存的置換でもよい。

20

【0065】

本明細書に開示される完全ヒト抗C5モノクローナル抗体は、対応する生殖系列配列と比較して、1つ又はそれ以上のアミノ酸置換、挿入及び/又は欠失を、重鎖及び軽鎖可変ドメインのフレームワーク領域及び/又はCDR領域に含み得る。このような変異は、本明細書に開示されるアミノ酸配列を、例えば公開抗体配列データベースから利用可能な生殖系列配列と比較することにより容易に確認され得る。本発明は、本明細書に開示されるアミノ酸配列のいずれかから誘導される抗体及びその抗原結合フラグメントを含み、ここで1つ又はそれ以上のフレームワーク領域及び/又はCDR領域中の1つ又はそれ以上のアミノ酸は、その抗体が誘導された生殖系列配列の対応する残基、又は別のヒト生殖系列配列の対応する残基、又は対応する生殖系列残基の保存的アミノ酸置換に変異されている（このような配列変化は、本明細書において集合的に「生殖系列変異」と呼ばれる）。当業者は、本明細書に開示される重鎖及び軽鎖可変領域配列から開始して、1つ又はそれ以上の個々の生殖系列変異又はその組み合わせを含む多数の抗体及び抗原結合フラグメントを容易に製造することができる。特定の実施態様において、V<sub>H</sub>及び/又はV<sub>L</sub>ドメイン内の全てのフレームワーク及び/又はCDR残基は、抗体が誘導された元の生殖系列配列中に見られる残基に変異して戻される。他の実施態様において、特定の残基のみが元の生殖系列配列に変異して戻される、例えば、FR 1の最初の8つのアミノ酸内もしくはFR 4の最後の8つのアミノ酸内に見られる変異した残基のみ、又はCDR 1、CDR 2もしくはCDR 3内に見られる変異した残基のみ。他の実施態様において、フレームワーク及び/又はCDR残基の1つ又はそれ以上は、異なる生殖系列配列の対応する残基に変異される（すなわち、抗体が元々誘導された生殖配列と異なる生殖配列）。さらに、本発明の抗体は、フレームワーク及び/又はCDR領域内の2つ又はそれ以上の生殖系列変異のいずれかの組み合わせを含有し得、例えば、ここで特定の個々の残基が特定の生殖系列配列の対応する残基へと変異され、一方で元の生殖系列配列とは異なる特定の他の残基は維持されるか、又は異なる生殖系列配列の対応する残基へと変異される。1つ又はそれ以上の生殖系列変異を含有する抗体及び抗原結合フラグメントが得られると、それらは改善された結合特異性、増加した結合親和性、改善されたか又は増強されたアンタゴニスト又はアゴニストの生物学的特性（場合によって）、減少した免疫原性などのような1つ又はそれ以

30

40

50

上の所望の特性について容易に試験され得る。この一般的な方法で得られる抗体及び抗原結合フラグメントは本発明内に包含される。

【0066】

本発明はまた、1つ又はそれ以上の保存的置換を有する本明細書に開示されるH C V R、L C V R、及び/又はC D Rアミノ酸配列のいずれかの変異体を含む完全ヒト抗C5モノクローナル抗体を含む。例えば、本発明は、本明細書に開示されるH C V R、L C V R、及び/又はC D Rアミノ酸配列のいずれかと比較して例えば、10又はそれ以下、8又はそれ以下、6又はそれ以下、4又はそれ以下などの保存的アミノ酸置換を有するH C V R、L C V R、及び/又はC D Rアミノ酸配列を有する抗C5抗体を含む。

【0067】

本明細書で使用される用語「ヒト抗体」は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列から誘導された可変領域及び定常領域を有する抗体を含むことを意図される。本発明のヒトmAbは、例えばC D R、及び特にC D R 3において、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によりコードされていないアミノ酸残基を含み得る（例えば、インピトロでのランダムもしくは部位特異的変異誘発により又はインピボでの体細胞変異により導入される変異）。しかし、本明細書で使用される用語「ヒト抗体」は、別の哺乳動物種（例えば、マウス）の生殖系列から誘導されたC D R配列がヒトF R配列上にグラフト化されているmAbを含むことは意図されない。この用語は、非ヒト哺乳動物において、又は非ヒト哺乳動物の細胞において組み換え的に産生された抗体を含む。この用語は、ヒト被験体から単離されたか又はヒト被験体において生成された抗体を含むことを意図されない。

【0068】

本明細書において使用される用語「組み換え（体）」は、例えば、DNAスプライシング及びトランスジェニック発現を含む組み換えDNA技術として当該分野で知られている技術又は方法により生成され、発現され、単離され、又は得られる本発明の抗体又はその抗原結合フラグメントを指す。この用語は、非ヒト哺乳動物（トランスジェニック非ヒト哺乳動物、例えば、トランスジェニックマウスを含む）、もしくは細胞（例えば、CHO細胞）発現系において発現されるか、又は組み換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離される抗体を指す。

【0069】

用語「特異的に結合する」又は「～に特異的に結合する」、又は同様のものは、抗体又はその抗原結合フラグメントが、生条件下で比較的安定な抗原との複合体を形成することを意味する。特異的結合は、少なくとも約 $1 \times 10^{-8}$  M又はそれ以下（例えば、より小さな $K_D$ はより緊密な結合を示す）の平衡解離定数を特徴とし得る。2つの分子が特異的に結合するかどうかを決定するための方法は当該分野で周知であり、そしてこれらとしては、例えば、平衡透析、表面プラズモン共鳴などが挙げられる。本明細書に記載される抗体は、表面プラズモン共鳴、例えば、B I A C O R E T Mにより同定されており、C5に特異的に結合する。さらに、C5における1つのドメイン及び1つもしくはそれ以上のさらなる抗原に結合する多選択性（multi-specific）抗体、又はC5の2つの異なる領域に結合する二重特異性は、それにもかかわらず、本明細書で使用される「特異的に結合する」抗体とみなされる。

【0070】

用語「高親和性」抗体は、表面プラズモン共鳴、例えば、B I A C O R E T M又は溶液アフィニティE L I S Aにより測定して、少なくとも $10^{-8}$  M；好ましくは $10^{-9}$  M；より好ましくは $10^{-10}$  M、なおより好ましくは $10^{-11}$  M、なおより好ましくは $10^{-12}$  Mの $K_D$ として表されるC5に対する結合親和性を有するmAbを指す。

【0071】

用語「遅い解離速度」、「K o f f」又は「k d」は、表面プラズモン共鳴、例えば、B I A C O R E T Mにより決定して、 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 又はそれ以下、好ましくは $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 又はそれ以下の速度定数でC5から解離する抗体を意味する。

【0072】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される用語抗体の「抗原結合部分」、抗体の「抗原結合フラグメント」などは、抗原と特異的に結合して複合体を形成するいずれかの天然に存在するか、酵素的に入手可能か、合成的、又は遺伝子的に操作されたポリペプチド又は糖タンパク質を含む。本明細書で使用される用語抗体の「抗原結合フラグメント」又は「抗体フラグメント」は、C5タンパク質に結合する能力を保持した抗体の1つ又はそれ以上のフラグメントを指す。

【0073】

特定の実施態様において、本発明の抗体又は抗体フラグメントは、リガンドもしくは治療的部分のような部分（「免疫結合体」）、第二の抗C5抗体、又はC5関連疾患もしくは障害を処置するために有用ないずれかの他の治療的部分に結合され得る。

10

【0074】

本明細書で使用される「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体（Ab）を実質的に含まない抗体を指すことを意図される（例えば、C5に特異的に結合する単離された抗体又はそのフラグメントは、C5意以外の抗原に特異的に結合するAbを実質的に含まない）。

【0075】

本明細書で使用される「遮断抗体」又は「中和抗体」（又は「C5活性を中和する抗体」又は「アンタゴニスト抗体」）は、C5へのその結合がC5の少なくとも1つの生物学的活性の阻害を生じる抗体を指すことを意図される。例えば、本発明の抗体は、古典的経路又は代替経路による補体媒介溶血を防止又は遮断し得る。

20

【0076】

本明細書で使用される用語「表面プラズモン共鳴」は、例えば、BIAcore™システム（Pharmacia Biosensor AB、Uppsala、Sweden and Piscataway、N.J.）を使用して、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度における変化の検出による実時間生体分子相互作用の分析を可能にする光学現象を指す。

【0077】

本明細書で使用される用語「K<sub>D</sub>」は、特定の抗体 - 抗原相互作用の平衡解離定数を指すことを意図される。

【0078】

用語「エピトープ」は、パラトープとして知られる抗体分子の可変領域における特異的抗原結合部位と相互作用する抗原性決定基を指す。単一の抗原が1つより多くのエピトープを有し得る。したがって、異なる抗体は、抗原上の異なる領域に結合し得、そして異なる生物学的効果を有し得る。用語「エピトープ」はまた、B及び/又はT細胞が応答する抗原上の部位を指す。これは抗体により結合される抗原の領域も指す。エピトープは構造的又は機能的として定義され得る。機能的エピトープは、一般的には構造的エピトープのサブセットであり、そして相互作用の親和性に直接寄与する残基を有する。エピトープはまた構造的であり得、すなわち、非線状アミノ酸から構成される。特定の実施態様において、エピトープは、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基、又はスルホニル基のような分子の化学的に活性な表面集団である決定基を含み得、そして特定の実施態様では、特異的三次元構造特徴、及び/又は特異的電荷特徴を有し得る。

30

40

【0079】

本明細書で使用される用語「交差競合する」は、抗体又はその抗原結合フラグメントが抗原に結合し、そして別の抗体又はその抗原結合フラグメントの結合を阻害又は遮断することを意味する。この用語はまた、両方向での2つの抗体間の競合も含み、すなわち、結合して第二の抗体の結合を遮断する第一の抗体およびその逆。特定の実施態様において、第一の抗体及び第二の抗体は同じエピトープに結合し得る。あるいは、第一及び第二の抗体は、異なるが重なっているエピトープに結合し得、その結果、一方の結合は第二の抗体の結合を、例えば立体障害により阻害又は遮断する。抗体間の交差競合は、当該分野で公知の方法により、例えば実時間無標識バイオレイヤー干渉アッセイにより測定され得る。2

50

つの抗体間の交差競合は、自己 - 自己結合（ここで第一及び第二の抗体は同じ抗体である）に起因するバックグラウンドシグナルより低い第二の抗体の結合として表され得る。2つの抗体間の交差競合は、例えば、ベースライン自己 - 自己バックグラウンド結合（ここで第一及び第二の抗体は同じ抗体である）より低い第二の抗体の結合%として表され得る。

#### 【0080】

核酸又はそのフラグメントに言及する場合の用語「実質的な同一性」又は「実質的に同一」は、別の核酸（又はその相補鎖）と適切なヌクレオチド挿入又は欠失を含んで最適に整列された場合に、以下に考察されるように、FASTA、BLAST又はGAPのような配列同一性のいずれかの周知のアルゴリズムにより測定して、ヌクレオチド塩基の少なくとも約90%、そしてより好ましくは少なくとも約95%、96%、97%、98%又は

10

#### 【0081】

ポリペプチドに適用される用語「実質的な類似性」又は「実質的に類似した」は、デフォルトギャップ重みを使用してGAP又はBESTFITのようなプログラムにより最適に整列された場合に、2つのペプチド配列が、少なくとも90%配列同一性、なおより好ましくは少なくとも95%、98%又は99%の配列同一性を共有することを意味する。好ましくは、同一でない残基位置は、保存的アミノ酸置換により異なる。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似した化学特性（例えば、電荷又は疎水性）を有する側鎖（R基）を有する別のアミノ酸残基で置換されているものである。一般に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的特性を実質的に変更しない。2つ又はそれ以上のアミノ酸配列が互いに保存的置換により異なる場合、類似性パーセント又は類似度は、置換の保存的性質を補正するために上方調整され得る。この調整を行う手段は当業者に周知である。例えば、Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307 - 331（これは参照により本明細書に加入される）を参照のこと。類似した化学特性を有する側鎖を有するアミノ酸のグループの例としては、1）脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン；2）脂肪族 - ヒドロキシル側鎖：セリン及びスレオニン；3）アミド含有側鎖：アスパラギン及びグルタミン；4）芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン；5）塩基性側鎖：リジン、アルギニン、及びヒスチジン；6）酸性側鎖：アスパラギン酸及びグルタミン酸、並びに7）硫黄含有側鎖：システイン及びメチオニンがあげられる。好ましい保存的アミノ酸置換グループは：バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、グルタミン酸 - アスパラギン酸、及びアスパラギン - グルタミンである。あるいは、保存的置換は、Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443 - 45（参照により本明細書に加入される）において開示されるPAM 250対数尤度行列において正の値を有する変化である。「中程度に保存的な」置換は、PAM 250対数尤度行列において負ではない値を有する変化である。

20

30

#### 【0082】

ポリペプチドについての配列類似性は、典型的には配列解析ソフトウェアを使用して測定される。タンパク質解析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む様々な置換、欠失及び他の改変に割り当てられた類似性の尺度を使用して類似した配列をマッチングする。例えば、GCGソフトウェアはGAP及びBESTFITのようなプログラムを含有し、これらはデフォルトパラメーターを用いて、密に関連するポリペプチド間、例えば異なる種の生物由来の相同ポリペプチド間、又は野生型タンパク質及びそのムテイン間の配列相同性又は配列同一性を決定するために使用され得る。例えば、GCGバージョン6.1を参照のこと。ポリペプチド配列はまた、FASTAを使用してデフォルト又は推奨パラメーターを使用して比較することができる；GCGバージョン6.1中のプログラム。FASTA（例えば、FASTA2及びFASTA3）は、クエリー配列と検索配列との間の最

40

50

大オーバーラップの領域のアラインメント及び配列同一性パーセントを提供する (Pearson (2000) 前出)。本発明の配列を、異なる生物由来の多数の配列を含有するデータベースと比較する場合に好ましい別のアルゴリズムは、デフォルトパラメーターを使用する、コンピュータプログラム BLAST、特に BLASTP 又は TBLASTN である。例えば、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 及び (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (これらはそれぞれ参照により本明細書に加入される) を参照のこと。

#### 【0083】

句「治療有効量」は、そのために投与される所望の効果を生じる量を意味する。正確な量は処置の目的に依存し、そして当業者により公知の技術を使用して確認可能である (例えば、Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding を参照のこと)。

#### 【0084】

本明細書で使用される用語「被験体」は、非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) 又は発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) のような C5 関連疾患又は障害の寛解、予防及び / 又は処置を必要とする動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトを指す。この用語は、このような疾患又は障害を有するか又は有する危険性のあるヒト被験体を含む。

#### 【0085】

本明細書で使用される用語「処置する」、「処置すること」又は「処置」は、本発明の抗体のような治療剤の、それを必要とする被験体への投与に起因する、C5 関連疾患又は障害の少なくとも 1 つの症状又は徴候の重症度の低減又は寛解を指す。これらの用語は、疾患の進行又は症状 / 徴候の悪化の阻害を含む。これらの用語はまた、疾患のポジティブな予後を含み、すなわち、被験体は、本発明の抗体のような治療剤を投与すると疾患がなくなり得るか又は減少した疾患を有し得る。治療剤は、被験体への治療的用量で投与され得る。

#### 【0086】

用語「予防する」、「予防すること」又は「予防」は、C5 関連疾患もしくは障害又はこのような疾患もしくは障害の徴候の出現を、本発明の抗体の投与の際に阻害することを指す。

#### 【0087】

抗体の抗原結合フラグメント

特に具体的に示されていなければ、本明細書で使用される用語「抗体」は、2 つの免疫グロブリン重鎖及び 2 つの免疫グロブリン軽鎖を含む抗体分子、すなわち、「完全抗体分子」、さらにはその抗原結合フラグメントを包含すると理解されるものとする。本明細書で使用される用語抗体の「抗原結合部分」、抗体の「抗原結合フラグメント」などは、抗原に特異的に結合して複合体を形成する、天然に存在するか、酵素的に得ることができるか、合成又は遺伝子的に操作されたポリペプチド又は糖タンパク質を含む。本明細書で使用される用語抗体の「抗原結合フラグメント」、又は「抗体フラグメント」は、C5 タンパク質に特異的に結合する能力を保持する抗体の 1 つ又はそれ以上のフラグメントを指す。抗体フラグメントとしては、Fab フラグメント、F(ab')<sub>2</sub> フラグメント、Fv フラグメント、dAb フラグメント、CDR を含有するフラグメント、又は単離された CDR が挙げられる。特定の実施態様において、用語「抗原結合フラグメント」は、多選択性抗原結合分子のポリペプチドフラグメントを指す。抗体の抗原結合フラグメントは、例えば、完全抗体分子から、タンパク質溶解消化又は抗体可変ドメイン及び (場合により) 定常ドメインをコードする DNA の操作及び発現を含む組み換え遺伝子操作のようないずれかの適切な標準的技術を使用して誘導され得る。このような DNA は、公知であり、かつ / 又は、例えば、商業的供給源、DNA ライブラリー (例えば、ファージ - 抗体ライブラリーを含む) から容易に入手可能であるか、又は合成することができる。DNA は配列決定され得、そして化学的操作されるか又は分子生物学技術を使用することにより、例えば、1 つもしくはそれ以上の可変及び / もしくは定常ドメインを適切な構成に配置し得るか

10

20

30

40

50

、又はコドンを導入するか、システイン残基を作製するか、アミノ酸を修飾、付加もしくは欠失するなどし得る。

【0088】

抗原結合フラグメントの非限定的な例としては：(i) Fabフラグメント；(ii) F(ab')<sub>2</sub>フラグメント；(iii) Fdフラグメント；(iv) Fvフラグメント；(v) 単鎖Fv(scFv)分子；(vi) dAbフラグメント；及び(vii) 抗体の超可変領域を模倣したアミノ酸残基からなる最小認識単位（例えば、CDR3ペプチドのような単離された相補性決定領域(CDR)）、又は拘束性FR3-CDR3-FR4ペプチドが挙げられる。ドメイン特異的抗体、単ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、CDR-グラフト化抗体、二重特異性抗体(diabodies)、三重特異性抗体(triabodies)、四重特異性抗体(tetrabodies)、ミニボディ(minibodies)、ナノボディ(nanobodies)（例えば、一価ナノボディ、二価ナノボディなど）、小モジュラー免疫薬(small modular immunopharmaceuticals)(SMIP)、及びサメ可変IgNARDメインのような他の操作された分子もまた、本明細書で使用される表現「抗原結合フラグメント」内に包含される。

【0089】

抗体の抗原結合フラグメントは、典型的には少なくとも1つの可変ドメインを含む。可変ドメインはいずれのサイズ又はアミノ酸組成のものでよく、そして一般的には少なくとも1つのCDRを含み、これは1つ又はそれ以上のフレームワーク配列に隣接するかインフレームである。V<sub>L</sub>ドメインと関連するV<sub>H</sub>ドメインを有する抗原結合フラグメントにおいて、V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインは、互いに対していずれかの適切な配置に位置し得る。例えば、可変領域は二量体であり得、そしてV<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>又はV<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>二量体であり得る。あるいは、抗体の抗原結合フラグメントは、単量体V<sub>H</sub>又はV<sub>L</sub>ドメインを含有し得る。

【0090】

特定の実施態様において、抗体の抗原結合フラグメントは、少なくとも1つの定常ドメインに共有結合で連結された少なくとも1つの可変ドメインを含有し得る。本発明の抗体の抗原結合フラグメント内に見られ得る可変及び定常ドメインの非限定的な例となる構成としては：(i) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1；(ii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2；(iii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>3；(iv) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2；(v) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3；(vi) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3；(vii) V<sub>H</sub>-C<sub>L</sub>；(viii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1；(ix) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2；(x) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>3；(xi) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2；(xii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3；(xiii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3；及び(xiv) V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>が挙げられる。上で列挙された例となる構成のいずれかを含めて可変及び定常ドメインのいずれかの構成において、可変及び定常ドメインは、互いに直接連結されていても、完全又は部分的ヒンジ又はリンカー領域により連結されていてもよい。ヒンジ領域は、少なくとも2つ（例えば、5、10、15、20、40、60又はそれ以上）のアミノ酸からなるものであり得、これは単一のポリペプチド分子中の隣接する可変及び/又は定常ドメイン間の可動性又は半可動性の連結を生じる。さらに、本発明の抗体の抗原結合フラグメントは、互いに非共有結合している、及び/又は1つもしくはそれ以上の単量体V<sub>H</sub>もしくはV<sub>L</sub>ドメインとの（例えば、ジスルフィド結合により）、上に列挙された可変及び定常ドメイン構成のいずれかのホモ二量体又はヘテロ二量体（又は他の多量体）を含み得る。

【0091】

完全抗体分子のように、抗原結合フラグメントは、単一特異的又は多選択的（例えば、二重特異性）であり得る。抗体の多選択性抗原結合フラグメントは、典型的には少なくとも2つの異なる可変ドメインを含み、ここで各可変ドメインは、別の抗原又は同じ抗原上の異なるエピトープに特異的に結合することができる。本明細書に開示される例となる二重特異性抗体形式を含むいずれの多選択性抗体形式も、当該分野で利用可能な通常の技術を使用して本発明の抗体の抗原結合フラグメントの状況における使用のために適合され得る。

## 【 0 0 9 2 】

## ヒト抗体の製造

トランスジェニックマウスにおいてヒト抗体を生成するための方法は当該分野で公知である。いずれかのこのような公知の方法を本発明の状況で使用して、C 5 タンパク質に特異的に結合するヒト抗体を製造することができる。

## 【 0 0 9 3 】

以下のいずれか 1 つを含む免疫原を使用して C 5 タンパク質に対する抗体を生成することができる。特定の実施態様において、本発明の抗体は、全長天然 C 5 タンパク質（例えば、GenBank 受け入れ番号 NP\_001726.2 を参照のこと）（配列番号 355）を用いて、又はそのタンパク質もしくはそのフラグメントをコードする DNA を用いて免疫されたマウスから得られる。あるいは、タンパク質又はそのフラグメントは、標準的な生化学的技術を使用して製造され得、改変され得、そして免疫原として使用され得る。本発明の特定の実施態様において、免疫原は、配列番号 355 のアミノ酸残基約 19 ~ 1676 の範囲に及ぶ C 5 タンパク質のフラグメントである。

10

## 【 0 0 9 4 】

いくつかの実施態様において、免疫原は、E. coli 又はいずれかの他の真核生物もしくはチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞のような哺乳動物細胞において発現される組み換え C 5 タンパク質又はそのフラグメントであり得る。

## 【 0 0 9 5 】

VELOCIMMUNE (R) 技術（例えば、US 6,596,541、Regeneron Pharmaceuticals、VELOCIMMUNE (R) を参照のこと）又はモノクローナル抗体を生成するためのいずれかの他の公知の方法を使用して、ヒト可変領域及びマウス定常領域を有する C 5 に対する高親和性キメラ抗体を最初に単離する。VELOCIMMUNE (R) 技術は、マウスが抗原性刺激に応じてヒト可変領域及びマウス定常領域を含む抗体を産生するように、内在性マウス定常領域遺伝子座に作動可能に連結されたヒト重鎖及び軽鎖可変領域を含むゲノムを有するトランスジェニックマウスの生成を含む。抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域をコードする DNA は単離され、そしてヒト重鎖及び軽鎖定常領域をコードする DNA に作動可能に連結される。ついで DNA を、完全ヒト抗体を発現することができる細胞において発現させる。

20

## 【 0 0 9 6 】

一般に、VELOCIMMUNE (R) マウスに、目的の抗原を負荷し、そしてリンパ球（例えば B 細胞）を、抗体を発現するマウスから回収する。リンパ球は、不死ハイブリドーマ細胞株を製造するために骨髓腫細胞株と融合され得、そしてこのようなハイブリドーマ細胞はスクリーニングされ、そして目的の抗原に特異的な抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を同定するために選択される。重鎖及び軽鎖の可変領域をコードする DNA は単離され得、そして重鎖及び軽鎖の所望のアイソタイプ定常領域に連結される。このような抗体タンパク質は CHO 細胞のような細胞で産生され得る。あるいは、抗原特異的キメラ抗体又は軽鎖及び重鎖の可変ドメインをコードする DNA が抗原特異的リンパ球から直接単離され得る。

30

## 【 0 0 9 7 】

最初に、ヒト可変領域及びマウス定常領域を有する高親和性キメラ抗体を単離する。以下の実験セクションにおけるように、抗体を特徴づけし、そして親和性、選択性、エピトープなどを含む所望の特徴について選択する。マウス定常領域を所望のヒト定常領域と置き換えて、本発明の完全ヒト抗体、例えば野生型又は改変された IgG1 又は IgG4 を生成する。選択された定常領域は特定の用途によって変わり得るが、高親和性抗原結合及び標的特異性特徴は可変領域に存在する。

40

## 【 0 0 9 8 】

## 生物学的同等性

本発明の抗 C 5 抗体及び抗体フラグメントは、記載された抗体と異なるアミノ酸配列を有するが、C 5 タンパク質に結合する能力は保持しているタンパク質を包含する。このよう

50

な変異体抗体及び抗体フラグメントは、親配列と比較した場合にアミノ酸の1つ又はそれ以上の付加、欠失、又は置換を有するが、記載された抗体と本質的に等価な生物学的活性を示す。同様に、本発明の抗体をコードするDNA配列は、開示された配列と比較した場合にヌクレオチドの1つ又はそれ以上の付加、欠失、又は置換を含むが、本発明の抗体又は抗体フラグメントと本質的に生物学的に同等である抗体又は抗体フラグメントをコードする配列を包含する。

【0099】

2つの抗原結合タンパク質、又は抗体は、例えば、それらが単回用量又は複数回用量のいずれかで同様の実験条件下で同じモル用量で投与された場合に、その吸収の速度及び程度が有意な差異を示さない薬学的等価物又は薬学的代替物である場合、生物学的に同等とみなされる。いくつかの抗体は、それらがそれらの吸収の程度において等価であるが吸収の速度では等価ではない場合に等価物又は薬学的代替物とみなされ、そしてさらに吸収速度におけるこのような差異は意図的ではなく、そして標識において反映され、例えば、慢性的使用での有効体内薬物濃度の達成には本質的ではなく、そして研究される特定の薬品には医学的に重要でないとみなされるので、生物学的に同等とみなされ得る。

10

【0100】

一実施態様において、2つの抗原結合タンパク質は、それらの安全性、純度、又は効力において臨床的に有意な差異がなければ生物学的に同等である。

【0101】

一実施態様において、2つの抗原結合タンパク質は、患者が参照製剤と生物学的製剤との間を、切り替えせずに継続した治療と比較して、免疫原性の臨床的に有意な変化を含む有害効果の危険性の予期される増加も、有効性の減少もなしに、1回又はそれ以上切り替えることができる場合に、生物学的に同等である。

20

【0102】

一実施態様において、2つの抗原結合タンパク質は、それらが両方共、使用の条件について共通の作用機序により、そのような機序が知られている程度まで作用する場合に生物学的に同等である。

【0103】

生物学的同等性はインビボ及び/又はインビトロの方法により実証され得る。生物学的同等性測定としては、例えば、(a)抗体又はその代謝物の濃度が、血液、血漿、血清、又は他の生体液において、時間の関数として測定される、ヒト又は他の哺乳動物におけるインビボ試験；(b)ヒトインビボバイオアベイラビリティデータと相関しており、かつ合理的に予測可能であるインビトロ試験；(c)抗体(又はその標的)の適切な急性薬理効果が時間の関数として測定される、ヒト又は他の哺乳動物におけるインビボ試験；及び(d)抗体の安全性、有効性、又はバイオアベイラビリティ又は生物学的透過性を確立する十分に管理された臨床試験において、が挙げられる。

30

【0104】

本発明の抗体の生物学的に等価な変異体は、例えば、残基もしくは配列の様々な置換を作製することにより、又は生物学的活性に必要でない末端もしくは内部残基もしくは配列を除去することにより構築され得る。例えば、生物学的活性に必須でないシステイン残基は、再生の際に不必要又は不正確な分子内ジスルフィド架橋の形成を防止するために、除去され得るか、又は他のアミノ酸と置き換えられ得る。他の状況において、生物学的に同等な抗体は、抗体のグリコシル化特徴を改変するアミノ酸変化、例えばグリコシル化を排除又は除去する変異を含む抗体変異体を含み得る。

40

【0105】

Fc変異体を含む抗C5抗体

本発明の特定の実施態様によれば、例えば、中性pHと比較して酸性pHで、FcRn受容体に対する抗体結合を増強するか又は減少させる1つ又はそれ以上の変異を含むFcドメインを含む抗C5抗体が提供される。例えば、本発明は、FcドメインのCH2又はCH3領域に変異を含む抗C5抗体を含み、ここで変異は酸性環境で(例えば、pHが約5

50



．５から約６．０の範囲に及ぶエンドソームにおいて）FcRnに対するFcドメインの親和性を増大させる。このような変異は、動物に投与された場合に抗体の血清半減期の増加を生じ得る。このようなFc改変の非限定的な例としては、例えば、位置２５０（例えば、E又はQ）；２５０及び４２８（例えば、L又はF）；２５２（例えば、L/Y/F/W又はT）、２５４（例えば、S又はT）、並びに２５６（例えば、S/R/Q/E/D又はT）での改変；又は位置４２８及び／若しくは４３３（例えば、H/L/R/S/P/Q又はK）及び／若しくは４３４（例えば、A、W、H、F又はY [N434A、N434W、N434H、N434F又はN434Y]）での改変；又は位置２５０及び／若しくは４２８での改変；又は位置３０７若しくは３０８（例えば、３０８F、V308F）、及び４３４での改変が挙げられる。一実施態様において、改変は、４２８L（例えば、M428L）及び４３４S（例えば、N434S）改変；４２８L、２５９I（例えば、V259I）、及び３０８F（例えば、V308F）改変；４３３K（例えば、H433K）及び４３４（例えば、４３４Y）改変；２５２、２５４、及び２５６（例えば、２５２Y、２５４T、及び２５６E）改変；２５０Q及び４２８L改変（例えば、T250Q及びM428L）；並びに３０７及び／又は３０８改変（例えば、３０８F又は３０８P）を含む。更に別の実施態様において、改変は２６５A（例えば、D265A）及び／又は２９７A（例えば、N297A）改変を含む。

10

#### 【０１０６】

例えば、本発明は、２５０Q及び２４８L（例えば、T250Q及びM248L）；２５２Y、２５４T及び２５６E（例えば、M252Y、S254T及びT256E）；４２８L及び４３４S（例えば、M428L及びN434S）；２５７I及び３１１I（例えば、P257I及びQ311I）；２５７I及び４３４H（例えば、P257I及びN434H）；３７６V及び４３４H（例えば、D376V及びN434H）；３０７A、３８０A及び４３４A（例えば、T307A、E380A及びN434A）；並びに４３３K及び４３４F（例えば、H433K及びN434F）からなる群より選択される変異の１つ又はそれ以上の対又は群を含むFcドメインを含む抗C5抗体を含む。本明細書に開示される前述のFcドメイン変異及び抗体可変ドメイン内の他の変異すべての可能な組み合わせが、本発明の範囲内に考慮される。

20

#### 【０１０７】

本発明はまた、キメラ重鎖定常（CH）領域を含む抗C5抗体を含み、ここでキメラCH領域は、１つより多くの免疫グロブリンアイソタイプのCH領域から誘導されたセグメントを含む。例えば、本発明の抗体は、ヒトIgG1、ヒトIgG2又はヒトIgG4分子から誘導されたCH3ドメインの一部又は全てと組み合わせられた、ヒトIgG1、ヒトIgG2又はヒトIgG4分子から誘導されたCH2ドメインの一部又はすべてを含むキメラCH領域を含み得る。特定の実施態様によれば、本発明の抗体は、キメラヒンジ領域を有するキメラCH領域を含む。例えば、キメラヒンジは、ヒトIgG1、ヒトIgG2又はヒトIgG4ヒンジ領域から誘導された「下部ヒンジ（lower hinge）」配列（EU番号付けにしたがって位置２２８から２３６のアミノ酸残基）と組み合わせられた、ヒトIgG1、ヒトIgG2又はヒトIgG4ヒンジ領域から誘導された「上部ヒンジ（upper hinge）」アミノ酸配列（EU番号付けに従って位置２１６から２２

30

40

#### 【０１０８】

抗体の生物学的特徴

一般に、本発明の抗体は、C5タンパク質に結合し、そしてC5a及びC5bへのその切

50

断を防止することにより機能する。例えば、本発明は、C 5 タンパク質に（例えば、2 5 又は 3 7 で）、例えば本明細書の実施例 3 において規定されるアッセイ形式を使用して表面プラズモン共鳴により測定して 9 n M 未満の  $K_D$  で結合する抗体及び抗体の抗原結合フラグメントを含む。特定の実施態様において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、例えば本明細書の実施例 3 において規定されるアッセイ形式、又は実質的に同様のアッセイを使用して表面プラズモン共鳴により測定して約 9 n M 未満、約 5 n M 未満、約 2 n M 未満、約 1 n M 未満、約 5 0 0 p M、2 5 0 p M 未満、又は 1 0 0 p M 未満の  $K_D$  で C 5 に結合する。

#### 【 0 1 0 9 】

本発明はまた、例えば本明細書の実施例 4 において規定されるアッセイ形式、又は実質的に同様のアッセイを使用して表面プラズモン共鳴により 2 5 で測定して、約 2 分より長い解離半減期（ $t_{1/2}$ ）でヒト C 5 タンパク質に結合する抗体及びその抗原結合フラグメントを含む。特定の実施態様において、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば本明細書の実施例 3 において規定されるアッセイ形式（例えば、m A b 捕捉又は抗原捕捉形式）、又は実質的に同様のアッセイを使用して表面プラズモン共鳴により 2 5 で測定して、約 5 分より長い、約 1 0 分より長い、約 3 0 分より長い、約 5 0 分より長い、約 1 0 0 分より長い、約 1 5 0 分より長い、約 2 0 0 分より長い、又は約 2 5 0 分より長い  $t_{1/2}$  で C 5 タンパク質に結合する。

#### 【 0 1 1 0 】

本発明はまた、例えば、本明細書の実施例 4 において規定されるアッセイ形式、又は実質的に同様のアッセイを使用して表面プラズモン共鳴により 3 7 で測定して、約 1 . 5 分より長い解離半減期（ヒト C 5 タンパク質に結合する抗体及びその抗原結合フラグメントを含む。特定の実施態様において、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、本明細書の実施例 3 において規定されるアッセイ形式（例えば、m A b 捕捉又は抗原捕捉形式）、又は実質的に同様のアッセイを使用して表面プラズモン共鳴により 3 7 で測定して、約 2 分より長い、約 5 分より長い、約 1 0 分より長い、約 2 5 分より長い、約 5 0 分より長い、約 1 0 0 分より長い、約 1 5 0 分より長い、又は約 2 0 0 分より長い  $t_{1/2}$  で C 5 タンパク質に結合する。

#### 【 0 1 1 1 】

本発明はまた、例えば、本明細書の実施例 3 において規定されるアッセイ形式を使用して表面プラズモン共鳴により測定して、1 2 0 n M 未満の  $K_D$  でサル C 5 タンパク質に（例えば、2 5 又は 3 7 で）結合する抗体及び抗体の抗原結合フラグメントを含む。特定の実施態様において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、例えば、本明細書の実施例 3 において規定されるアッセイ形式、又は実質的に同様のアッセイを使用して表面プラズモン共鳴により測定して、約 1 2 0 n M 未満、約 1 0 0 n M 未満、約 5 0 n M 未満、約 2 5 n M 未満、約 1 0 n M 未満、約 5 n M 未満、約 1 n M 未満、約 5 0 0 p M、又は 2 5 0 p M 未満の  $K_D$  でサル C 5 に結合する。

#### 【 0 1 1 2 】

本発明はまた、例えば、本明細書の実施例 3 において規定されるアッセイ形式を使用して表面プラズモン共鳴により測定して 7 0 n M 未満の  $K_D$  で、R 8 8 5 H 変化（配列番号 3 5 6 により例示される）を有する改変されたヒト C 5 タンパク質に結合する抗体及び抗体の抗原結合フラグメントを含む。C 5 変異体は、当該分野で以前に開示された抗 C 5 抗体に対する不十分な応答を示した（例えば、N i s h i m u r a e t a l 2 0 1 4、N e w E n g l . J . M e d . 3 7 0 : 6 3 2 - 6 3 9）。特定の実施態様において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、例えば、本明細書の実施例 3 において規定されるアッセイ形式、又は実質的に同様のアッセイを使用して表面プラズモン共鳴により測定して、約 6 5 n M 未満、約 5 0 n M 未満、約 2 0 n M 未満、約 1 0 n M 未満、約 5 n M 未満、約 3 n M 未満、又は 2 n M 未満の  $K_D$  で改変されたヒト C 5 に結合する。

#### 【 0 1 1 3 】

本発明はまた、R 8 8 5 C 変化を有する改変されたヒト C 5 タンパク質（配列番号 3 5 7

10

20

30

40

50

により例示される)に、例えば、本明細書の実施例3において規定されるアッセイ形式を使用して表面プラズモン共鳴により測定して160 nM未満の $K_D$ で結合する抗体及び抗体の抗原結合フラグメントを含む。C5変異体は、当該分野で以前に開示された抗C5抗体に対して不十分な応答を示した(例えば、Nishimura et al 2014、New Engl. J. Med. 370:632-639)。特定の実施態様において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、例えば、本明細書の実施例3において規定されるアッセイ形式、又は実質的に同様のアッセイを使用して表面プラズモン共鳴により測定して、約150 nM未満、約100 nM未満、約50 nM未満、約20 nM未満、約10 nM未満、約5 nM未満、又は2 nM未満の $K_D$ で改変されたヒトC5に結合する。

【0114】

10

本発明はまた、例えば、本明細書の実施例6において規定されるアッセイ形式を使用してルミネッセンスアッセイにより測定して、10 nM未満の $IC_{50}$ で補体依存性細胞傷害(CDC)を阻害する抗体及び抗体の抗原結合フラグメントを含む。特定の実施態様において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、例えば、本明細書の実施例6において規定されるアッセイ形式又は実質的に同様のアッセイを使用してB細胞ルミネッセンスアッセイにより測定して、約5 nM未満、約3.5 nM未満、又は約2 nM未満の $IC_{50}$ でCDCを阻害する。

【0115】

本発明はまた、ヒトC5媒介古典的経路(CP)溶血を、例えば、本明細書の実施例8において規定されるアッセイ形式を使用してCP溶血アッセイにより測定して6 nM未満の $IC_{50}$ で94%より多く遮断する抗体及び抗原結合フラグメントを含む。特定の実施態様において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、例えば、本明細書の実施例8において規定されるアッセイ形式又は実質的に同様のアッセイを使用して、CP溶血アッセイにより測定して、約6 nM未満、約5 nM未満、約4 nM未満、約3 nM未満、又は約2 nM未満の $IC_{50}$ でCP溶血を遮断する。

20

【0116】

本発明はまた、例えば、本明細書の実施例8において規定されるアッセイ形式を使用して、AP溶血アッセイにより測定して165 nM未満の $IC_{50}$ で70%より多くヒトC5媒介代替経路(AP)溶血を遮断する抗体及び抗原結合フラグメントを含む。特定の実施態様において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、例えば、本明細書の実施例8において規定されるアッセイ形式又は実質的に同様のアッセイを使用して、AP溶血アッセイにより測定して約160 nM未満、約150 nM未満、約100 nM未満、約50 nM未満、又は約20 nM未満の $IC_{50}$ でAP溶血を遮断する。

30

【0117】

本発明はまた、例えば、本明細書の実施例8において規定されるアッセイ形式を使用して、CP溶血アッセイにより測定して185 nM未満の $IC_{50}$ で、アフリカミドリザルC5媒介古典的経路(CP)溶血を40%より多く遮断する抗体及び抗原結合フラグメントを含む。特定の実施態様において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、例えば、本明細書の実施例8において規定されるアッセイ形式又は実質的に同様のアッセイを使用して、CP溶血アッセイにより測定して約180 nM未満、約150 nM未満、約100 nM未満、約75 nM、又は約50 nM未満の $IC_{50}$ でCP溶血を遮断する。

40

【0118】

本発明はまた、例えば、本明細書の実施例8において規定されるアッセイ形式を使用してAP溶血アッセイにより測定して、235 nM未満の $IC_{50}$ でアフリカミドリザルC5媒介代替経路(AP)を遮断する抗体及び抗原結合フラグメントを含む。特定の実施態様において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、例えば、本明細書の実施例8において規定されるアッセイ形式又は実質的に同様のアッセイを使用して、AP溶血アッセイにより測定して、約200 nM未満、約150 nM未満、約100 nM未満、約50 nM未満、又は約20 nM未満の $IC_{50}$ でAP溶血を遮断する。

【0119】

50

本発明はまた、例えば、本明細書の実施例 8 において規定されるアッセイ形式を使用して、C P 溶血アッセイにより測定して、145 nM 未満の IC<sub>50</sub> でカニクイザル C 5 媒介古典的経路 (C P) 溶血を 90 % より多く遮断する抗体及び抗原結合フラグメントを含む。特定の実施態様において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、例えば、本明細書の実施例 8 において規定されるアッセイ形式又は実質的に同様のアッセイを使用して、C P 溶血アッセイにより測定して、約 140 nM 未満、約 120 nM 未満、約 100 nM 未満、約 75 nM 未満、又は約 50 nM 未満の IC<sub>50</sub> で C P 溶血を遮断する。

#### 【0120】

本発明はまた、例えば、本明細書の実施例 8 において規定されるアッセイ形式を使用して、A P 溶血アッセイにより測定して、30 nM 未満の IC<sub>50</sub> で果肉老猿 C 5 媒介代替経路 (A P) 溶血を遮断する抗体及び抗原結合フラグメントを含む。特定の実施態様において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、例えば、本明細書の実施例 8 において規定されるアッセイ形式又は実質的に同様のアッセイを使用して、A P 溶血アッセイにより測定して、約 25 nM 未満、約 20 nM 未満、約 10 nM 未満、約 5 nM 未満、又は約 2 nM 未満の IC<sub>50</sub> で A P 溶血を遮断する。

10

#### 【0121】

本発明はまた、当該分野の抗 C 5 抗体と比較して改善された薬物動態 (P K) 及び薬力学 (P D) 特性を示す抗体及び抗原結合フラグメントを含む。本発明の抗 C 5 抗体は、本明細書の実施例 9 及び 10 に示されるように、投与の際に標的媒介クリアランスのより低い感受性を示す。特定の実施態様において、本発明は、例えば、20 日より長い、25 日より長い、30 日より長い、35 日より長い、40 日より長い、45 日より長い、50 日より長い、55 日より長い、又は 60 日より長い、延長された期間の間血清濃度示す抗 C 5 抗体及びその抗原結合フラグメントを含む。特定の実施態様において、本発明の抗 C 5 抗体は、当該分野における抗 C 5 抗体と比較して、10 日より長い延長された血清半減期を示す。

20

#### 【0122】

特定の実施態様において、本発明は、ヒト C 5 に対して高い親和性 (例えば、0.3 nM 未満の K<sub>D</sub>) 及びより低いクリアランス (例えば、延長された血清半減期、以前に知られている抗 C 5 抗体よりも長い日数にわたる改善された薬力学的活性) を有する抗 C 5 抗体及びその抗原結合フラグメントを提供する。本発明のこのような抗体は、C 5 関連疾患又は障害を有する被験体においてより少ない投薬頻度で有利に使用され得る。

30

#### 【0123】

一実施態様において、本発明は、C 5 タンパク質に特異的に結合する単離された組み換え抗体又はその抗原結合フラグメントを提供し、ここで抗体又はそのフラグメントは、以下の特徴の 1 つ又はそれ以上を示す：(a) 完全ヒトモノクローナル抗体である；(b) 表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定して、25 で 0.9 nM 未満の解離定数 (K<sub>D</sub>) でヒト C 5 に結合する；(c) 表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定して、37 で 0.3 nM 未満の K<sub>D</sub> でヒト C 5 に結合する；(d) カニクイザルへの投与の際に 70 日間にわたって 10 µg / mL より高い血清濃度を有する；(e) エクスビボ溶血アッセイにおいて測定して、カニクイザルへの投与の際に 35 日間にわたって C P 溶血及び A P 溶血を遮断する；(f) カニクイザルにおいて 10 日より長い血清半減期を有する；(g) C 5 ヒト化マウスへの投与の際に 40 日間にわたって 10 µg / mL より高い血清濃度を有する；(h) エクスビボ溶血アッセイにおいて測定して、C 5 ヒト化マウスへの投与の際に 30 日間にわたって C P 溶血を遮断する；並びに (i) C 5 ヒト化マウスにおいて 10 日より長い血清半減期を有する。

40

#### 【0124】

一実施態様において、本発明は、C 5 タンパク質に特異的に結合する単離された組み換え抗体又はその抗原結合フラグメントを提供し、ここで抗体又はそのフラグメントは、以下の特徴の 1 つ又はそれ以上を示す：(a) 完全ヒトモノクローナル抗体である；(b) 表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定して、25 で 0.9 nM 未満の解離定数 (K<sub>D</sub>

50

）でヒトC5に結合する；（c）表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定して、37で0.3 nM未満のK<sub>D</sub>でヒトC5に結合する；（d）表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定して、65 nM未満のK<sub>D</sub>でサルC5に結合する；（e）表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定して、0.5 nM未満のK<sub>D</sub>でヒトC5変異体R885H（配列番号356）に結合する；（f）表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定して、0.5 nM未満のK<sub>D</sub>でヒトC5変異体R885C（配列番号357）に結合する；（g）CP溶血アッセイにおいて測定して、6 nM未満のIC<sub>50</sub>でヒトC5媒介古典的経路（CP）溶血を95%より多く遮断する；（h）AP溶血アッセイにおいて測定して、165 nM未満のIC<sub>50</sub>でヒトC5媒介代替経路（AP）溶血を70%より多く遮断する；（i）CP溶血アッセイにおいて測定して、185 nM未満のIC<sub>50</sub>でアフリカミドリザルC5媒介CP溶血を阻害する；（j）AP溶血アッセイにおいて測定して、235 nM未満のIC<sub>50</sub>でアフリカミドリザルC5媒介AP溶血を阻害する；（k）CP溶血アッセイにおいて測定して、145 nM未満のIC<sub>50</sub>でカニクイザルC5媒介CP溶血を阻害する；及び（l）AP溶血アッセイにおいて測定して、30 nM未満のIC<sub>50</sub>でカニクイザルC5媒介AP溶血を阻害する。

#### 【0125】

本発明の抗体は、前述の生物学的特徴の1つ若しくはそれ以上、又はそれらの組み合わせを有し得る。本発明の抗体の他の生物学的特徴は、本明細書の実施例を含む本開示を検討することにより当業者に明らかとなる。

#### 【0126】

エピトープマッピング及び関連技術

本発明は、アルファポリペプチド及びベータポリペプチドを含むC5タンパク質分子の1つ又はそれ以上の領域内に見出される1つ又はそれ以上のアミノ酸と相互作用する抗C5抗体を含む。抗体が結合するエピトープは、C5タンパク質分子の上述のドメインのいずれか（例えば、ドメイン中の線状エピトープ）内に位置する3つ又はそれ以上例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又はそれ以上）のアミノ酸の単一の連続した配列からなるものであり得る。あるいは、エピトープは、タンパク質分子の上述のドメイン（例えば、構造的エピトープ）のいずれか又は両方内に位置する複数の非連続アミノ酸（又はアミノ酸配列）からなるものであり得る。

#### 【0127】

当業者に公知の様々な技術を、抗体がポリペプチド又はタンパク質内の「1つ又はそれ以上のアミノ酸と相互作用する」かどうかを決定するために使用することができる。例となる技術としては、例えば、Antibodies、Harlow and Lane（Cold Spring Harbor Press、Cold Spring Harbor、NY）に記載されるような、慣用の交差-ブロッキングアッセイが挙げられる。他の方法としては、アラニンスキャニング変異分析、ペプチドプロット分析（Reineke（2004）Methods Mol. Biol. 248：443-63）、ペプチド切断分析結晶学的研究及びNMR分析が挙げられる。さらに、エピトープ切除、エピトープ抽出及び抗原の化学修飾のような方法が使用され得る（Tomer（2000）Prot. Sci. 9：487-496）。抗体が相互作用するポリペプチド内のアミノ酸を同定するために使用することができる別の方法は、質量分析により検出される水素/重水素交換である。一般的に、水素/重水素法は、目的のタンパク質の重水素標識、続いて抗体の重水素標識タンパク質への結合を含む。次に、タンパク質/抗体複合体は水に移され、そして抗体複合体により保護されているアミノ酸内の交換可能なプロトンは、界面の一部ではないアミノ酸内の交換可能なプロトンよりも遅い速度で重水素から水素への逆交換を受ける。結果として、タンパク質/抗体界面の一部を形成するアミノ酸は重水素を保持し得、したがって界面に含まれていないアミノ酸と比較して比較的高い質量を示す。抗体の解離後、標的タンパク質をプロテアーゼ切断及び質量分析にかけて、それにより抗体が相互作用する特定のアミノ酸に対応する重水素標識残基を明らかにする。例えば、Ehrin

10

20

30

40

50

g ( 1 9 9 9 ) A n a l y t i c a l B i o c h e m i s t r y 2 6 7 : 2 5 2 - 2 5 9 ; E n g e n a n d S m i t h ( 2 0 0 1 ) A n a l . C h e m . 7 3 : 2 5 6 A - 2 6 5 A を参照のこと。

【 0 1 2 8 】

用語「エピトープ」はB及び/又はT細胞が応答する抗原上の部位を指す。B細胞エピトープは、タンパク質の三次元折りたたみにより並置された連続的アミノ酸又は非連続的アミノ酸の両方から形成され得る。連続的アミノ酸から形成されたエピトープは、典型的には変性溶媒に露出されて保持されるが、一方三次元折りたたみにより形成されたエピトープは、変性溶媒での処理で典型的に失われる。エピトープは典型的には、少なくとも3、そしてより通常では少なくとも5又は8～10のアミノ酸を独特の空間配置で含む。

10

【 0 1 2 9 】

抗原構造ベースの抗体プロファイリング ( A S A P ) としても知られる修飾援用プロファイリング ( M o d i f i c a t i o n - A s s i s t e d P r o f i l i n g ) ( M A P ) は、化学的又は酵素的に修飾された抗原表面への各抗体の結合プロファイルの類似性に従って、同じ抗原に特異的な多数のモノクローナル抗体 ( m A b ) を分類する方法である ( U S 2 0 0 4 / 0 1 0 1 9 2 0 ( 参照によりその全体として本明細書に具体的に加入される ) を参照のこと ) 。各カテゴリーは、別のカテゴリーにより表されるエピトープと非常に異なるか又は部分的に重なる特有のエピトープを反映し得る。この技術は、遺伝子的に同一の抗体の高速フィルタリングを可能にし、その結果特徴付は、遺伝子的に異なる抗体に集中され得る。ハイブリドーマスクリーニングに適用される場合、M A P は所望の特徴を有する m A b を生じる希少なハイブリドーマクロンの同定を容易にし得る。M A P は、本発明の抗体を、異なるエピトープに結合する抗体のグループに分類するために使用され得る。

20

【 0 1 3 0 】

特定の実施態様において、抗C5抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号355において例示される天然形態、又は組み換え産生されたC5タンパク質、又はそのフラグメントにおいて例示される領域のいずれか1つ又はそれ以上内のエピトープに結合する。いくつかの実施態様において、本発明の抗体は、ヒトC5タンパク質のアミノ酸残基19～1676からなる群より選択される1つ又はそれ以上のアミノ酸を含む領域に結合する。

【 0 1 3 1 】

特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号355のおよそ位置19からおよそ位置750までの範囲に及ぶアミノ酸残基；又はおよそ位置751からおよそ位置1676の範囲に及ぶアミノ酸残基からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列と相互作用する。

30

【 0 1 3 2 】

特定の実施態様において、本発明は、C5 ( 配列番号359 ) のアルファ鎖及び/又はベータ鎖内に見出される1つ又はそれ以上のエピトープと相互作用する抗C5抗体及びその抗原結合フラグメントを含む。エピトープは、C5のアルファ鎖及び/又はベータ鎖内に位置する3つ又はそれ以上 ( 例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又はそれ以上 ) のアミノ酸の1つ又はそれ以上の連続配列からなるものであり得る。あるいは、エピトープは、C5内に位置する複数の非連続アミノ酸 ( 又はアミノ酸配列 ) からなるものであり得る。本明細書の実施例11に示されるように、本発明の例となる抗体H4H12166Pが相互作用するC5のエピトープは：( i ) 配列番号359のベータ鎖に含まれるアミノ酸591～599に対応するアミノ酸配列N M A T G M D S W ( 配列番号360 ) ；及び( i i ) 配列番号359のアルファ鎖に含まれるアミノ酸775～794に対応するアミノ酸配列W E V H L V P R R K Q L Q F A L P D S L ( 配列番号361 ) により定義される。従って、本発明は、( i ) 配列番号359のアミノ酸591～599に対応するアミノ酸配列N M A T G M D S W ( 配列番号360 ) ；及び( i i ) 配列番号359のアミノ酸775～794に対応するアミノ酸配列W E V H L V P R R K Q L Q F A L P D S L ( 配列番号361 ) が

40

50

らなる領域内に含有される１つ又はそれ以上のアミノ酸と相互作用する抗Ｃ５抗体を含む。

【０１３３】

本発明は、表１に列挙される特定の例となる抗体のいずれかと同じエピトープ又は該エピトープの一部に結合する抗Ｃ５抗体を含む。同様に、本発明はまた、表１に列挙される特定の例となる抗体のいずれかと、Ｃ５タンパク質又はそのフラグメントに対する結合について競合する抗Ｃ５抗体も含む。例えば、本発明は、表１に列挙される１つ又はそれ以上の抗体と、Ｃ５タンパク質に対する結合について交差競合する抗Ｃ５抗体を含む。

【０１３４】

当該分野で公知の慣用の方法を使用することにより、抗体が参照抗Ｃ５抗体と同じエピトープに結合するかどうか、又は参照Ｃ５抗体と結合について競合するかどうかを容易に決定することができる。例えば、試験抗体が本発明の参照抗Ｃ５抗体と同じエピトープに結合するかどうかを決定するために、参照抗体は、飽和条件下でＣ５タンパク質又はペプチドに結合させられる。次に、Ｃ５分子に結合する試験抗体の能力を評価する。試験抗体が、参照抗Ｃ５抗体との飽和結合後にＣ５に結合することができる場合、試験抗体は参照抗Ｃ５抗体と異なるエピトープに結合すると結論付けることができる。他方で、試験抗体が参照抗Ｃ５抗体との飽和結合後にＣ５に結合する事ができない場合、試験抗体は本発明の参照抗Ｃ５抗体により結合されるエピトープと同じエピトープに結合するかもしれない。

【０１３５】

参照抗Ｃ５抗体との結合について抗体が競合するかどうかを決定するために、上記の結合方法論を２つの方向性で行う：第一の方向性では、参照抗体を飽和条件下でＣ５タンパク質に結合させて、続いてＣ５分子への試験抗体の結合を評価する。第二の方向性では、試験抗体を飽和条件下でＣ５分子に結合させて、続いて参照抗体のＣ５分子への結合を評価する。両方の方向性において、第一（飽和）抗体のみがＣ５分子に結合することができる場合、試験抗体及び参照抗体はＣ５結合について競合すると結論付けられる。当業者には当然のことながら、参照抗体との結合について競合する抗体は、必ずしも参照抗体と同一のエピトープに結合していないかもしれないが、重なっているか又は隣接するエピトープに結合することにより参照抗体の結合を立体的にブロックし得る。

【０１３６】

２つの抗体は、それぞれが抗原への他方の結合を競合的に阻害する（遮断する）場合、同じか又は重なっているエピトープに結合する。すなわち、１倍、５倍、１０倍、２０倍又は１００倍過剰の一方の抗体は、競合結合アッセイ（例えば、Jung et al., Cancer Res. 1990 50: 1495 - 1502を参照のこと）で測定して、他方の結合を少なくとも５０％阻害するが、好ましくは７５％、９０％又は９９％も阻害するあるいは、一方の抗体の結合を減少させるか又は排除する抗原中の本質的に全てのアミノ酸変異が他方の結合を減少させるか又は排除する場合、２つの抗体は同じエピトープを有する。一方の抗体の結合を減少させるか又は排除するいくつかのアミノ酸変異が他方の結合を減少させるか又は排除する場合、２つの抗体は重なったエピトープを有する。

【０１３７】

ついで、さらなる慣用の実験（例えば、ペプチド変異及び結合解析）を行って、観察された試験抗体の結合がないことが、実際に参照抗体と同じエピトープへの結合に起因するか、又は立体ブロッキング（又は別の減少）が観察された結合の無いことの原因であるかどうかを確認することができる。この種の実験は、ELISA、RIA、表面プラズモン共鳴、フローサイトメトリー又は当該分野で利用可能ないずれかの他の定量的若しくは定性的な抗体結合アッセイを使用して行うことができる。

【０１３８】

免疫結合体

本発明は、Ｃ５関連疾患又は障害（例えば、非典型溶血性尿毒症症候群）を処置するための、治療的部分に結合されたヒト抗Ｃ５モノクローナル抗体（免疫結合体）を包含する。本明細書で使用される用語「免疫結合体」は、放射性薬剤、サイトカイン、インターフェ

10

20

30

40

50

ロン、標的又はレポーター部分、酵素、ペプチド若しくはタンパク質又は治療剤に化学的又は生物学的に連結されている抗体を指す。抗体は、その標的と結合できる限り、分子に沿ったいずれの位置でも放射性薬剤、サイトカイン、インターフェロン、標的又はレポーター部分、酵素、ペプチド又は治療剤に連結され得る。免疫結合体の例としては、抗体薬物結合体及び抗体-毒素融合タンパク質が挙げられる。一実施態様において、薬剤はC5タンパク質に対する第二の異なる抗体であり得る。抗C5抗体に結合され得る治療の部分の種類は、処置しようとする状態及び達成しようとする所望の治療効果を考慮に入れる。免疫結合体を形成するための適切な薬剤の例は当該分野で公知である；例えば、WO 05/103081を参照のこと。

#### 【0139】

##### 多選択性抗体

本発明の抗体は単一特異性でも、二重特異性でも、多選択性でもよい。多選択性抗体は、1つの標的ポリペプチドの異なるエピトープに特異的であっても、1つより多くの標的ポリペプチドに特異的な抗原結合ドメインを含有していてもよい、例えば、Tutt et al.、1991、J. Immunol. 147:60-69；Kuffer et al.、2004、Trends Biotechnol. 22:238-244を参照のこと。

#### 【0140】

本発明の多選択性抗原結合分子のいずれか又はその変異体は、当業者に公知であるような標準的な分子生物学技術（例えば、組み換えDNA及びタンパク質発現技術）を使用して構築され得る。

#### 【0141】

いくつかの実施態様において、C5特異的抗体は、C5タンパク質の異なるドメインに結合する可変領域が一緒に連結されて、単一結合分子内に二重ドメイン特異性をもたらす二重特異性形式（「二重特異性（bi-specific）」）で生成される。適切に設計された二重特異性は、特異性及び結合力の両方を増加させることによりC5タンパク質阻害有効性全体を増強し得る。個々のドメイン（例えば、N末端ドメインのセグメント）に対して特異性を有するか又は1つのドメイン内の異なる領域に結合することができる可変領域は、構造足場上で対になり、各領域が別々のエピトープ又は1つのドメイン内の異なる領域に同時に結合することを可能にする。二重特異性についての一例において、1つのドメインに対して特異性を有する結合剤由来の重鎖可変領域（V<sub>H</sub>）は、そのV<sub>H</sub>に対する元の特異性を破壊することなく元のV<sub>H</sub>と対になることができる非同族V<sub>L</sub>パートナーを同定するために、第二のドメインに対する特異性を有する一連の結合剤由来の軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>）と再結合される。このようにして、単一V<sub>L</sub>セグメント（例えば、V<sub>L</sub>1）は、2つの異なるV<sub>H</sub>ドメイン（例えば、V<sub>H</sub>1及びV<sub>H</sub>2）と結合されて、2つの結合「アーム」（V<sub>H</sub>1-V<sub>L</sub>1及びV<sub>H</sub>2-V<sub>L</sub>1）から構成される二重特異性を生じる。単一V<sub>L</sub>セグメントの使用は、系の複雑さを低減し、そしてそれにより、二重特異性を生成するために使用されるクローニング、発現、及び精製のプロセスを単純化し、それらのおける有効性を増加させる（例えば、US 2013/022759及びUS 2010/0331527）。

#### 【0142】

あるいは、1つより多くのドメイン、及び限定されないが、例えば第二の異なる抗C5抗体のような第二の標的に結合する抗体は、本明細書に記載される技術、又は当業者に公知の他の技術を使用して二重特異性形式で製造され得る。異なる領域に結合する抗体可変領域は、例えばC5の細胞外ドメイン上の関連する部位に結合する可変領域と一緒に連結されて、単一結合分子内に二重抗原特異性をもたらし得る。この性質の適切に設計された二重特異性は二重機能に役立つ。細胞外ドメインに対して特異性を有する可変領域は、細胞外ドメインの外側に対して特異性を有する可変領域と結合され、そして各可変領域が別々の抗原に結合することを可能にする構造足場上で対にされる。

#### 【0143】

本発明の状況において使用され得る例となる二重特異性抗体形式は、第一の免疫グロブリ

10

20

30

40

50



ン ( I g ) C H 3 ドメイン及び第二の I g C H 3 ドメインの使用を含み、ここで第一及び第二の I g C H 3 ドメインは、互いに少なくとも 1 アミノ酸異なり、そしてここで少なくとも 1 つのアミノ酸差異は、アミノ酸差異の無い二重特異性抗体と比較して、プロテイン A に対する二重特異性抗体の結合を減少させる。一実施態様において、第一の I g C H 3 ドメインはプロテイン A に結合し、そして第二の I g C H 3 ドメインは、H 9 5 R 改変 ( I M G T エクソン番号付けによる ; E U 番号付けでは H 4 3 5 R ) のようなプロテイン A 結合を減少させるか又は消失させる変異を含有する。第二の C H 3 は Y 9 6 F 改変 ( I M G T による ; E U では Y 4 3 6 F ) を更に含み得る。第二の C H 3 内に見られ得るさらなる改変としては : I g G 1 抗体の場合、D 1 6 E、L 1 8 M、N 4 4 S、K 5 2 N、V 5 7 M、及び V 8 2 I ( I M G T による ; E U では D 3 5 6 E、L 3 5 8 M、N 3 8 4 S、K 3 9 2 N、V 3 9 7 M、及び V 4 2 2 I ) ; I g G 2 抗体の場合、N 4 4 S、K 5 2 N、及び V 8 2 I ( E U では I M G T ; N 3 8 4 S、K 3 9 2 N、及び V 4 2 2 I ) ; 並びに I g G 4 抗体の場合、Q 1 5 R、N 4 4 S、K 5 2 N、V 5 7 M、R 6 9 K、E 7 9 Q、及び V 8 2 I ( I M G T による ; E U では Q 3 5 5 R、N 3 8 4 S、K 3 9 2 N、V 3 9 7 M、R 4 0 9 K、E 4 1 9 Q、及び V 4 2 2 I ) が挙げられる。上記の二重特異性抗体でのバリエーションは本発明の範囲で検討される。

#### 【 0 1 4 4 】

本発明の状況において使用され得る他の例となる二重特異性形式としては、限定することなく、例えば、s c F v ベース又は二特異性抗体 ( d i a b o d y ) 二重特異性形式、I g G - s c F v 融合物、二重可変ドメイン ( D V D ) - I g、クアドローマ、ノブ・イントゥ・ホール ( k n o b s - i n t o - h o l e s )、共通軽鎖 (例えば、ノブ・イントゥ・ホールとの共通軽鎖など)、C r o s s M a b、C r o s s F a b、( S E E D ) ボディ、ロイシンジッパー、D u o b o d y、I g G 1 / I g G 2、二重作用 F a b ( D A F ) - I g G、及び M a b 2 二重特異性形式 (前述の形式の概説については、例えば、K l e i n e t a l . 2 0 1 2、m A b s 4 : 6、1 - 1 1、及びそこに引用される参考文献を参照のこと)。二重特異性抗体はまた、ペプチド / 核酸結合体を使用して構築することもでき、例えば、ここで直交化学反応性を有する非天然アミノ酸を使用して、部位特異的抗体 - オリゴヌクレオチド結合体を生成し、ついでこれが自己集合して規定された組成、原子価及び配置を有する多量体複合体となる。(例えば、K a z a n e e t a l .、J . A m . C h e m . S o c . [ E p u b : D e c . 4、2 0 1 2 ] )。

#### 【 0 1 4 5 】

##### 治療的投与及び製剤

本発明は、本発明の抗 C 5 抗体又はその抗原結合フラグメントを含む治療用組成物を提供する。本発明に従う治療用組成物は、適切な担体、賦形剤、及び改善された輸送、送達、耐性などを提供するために製剤中に組み込まれる他の薬剤とともに投与される。多数の適切な製剤が、全ての薬剤師に知られる処方集において見られ得る : R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s、M a c k P u b l i s h i n g C o m p a n y、E a s t o n、P A。これらの製剤としては、例えば、散剤、ペースト剤、軟膏、ゼリー、ワックス、オイル、脂質、脂質 (カチオン性又はアニオン性) 含有小胞 (例えば、L I P O F E C T I N T M)、DNA 結合体、無水吸収ペースト、水中油及び油中水乳剤、c a r b o w a x 乳剤 (e m u l s i o n s c a r b o w a x) (様々な分子量のポリエチレングリコール)、半固形ゲル、及び c a r b o w a x を含有する半固形混合物が挙げられる。P o w e l l e t a l .「C o m p e n d i u m o f e x c i p i e n t s f o r p a r e n t e r a l f o r m u l a t i o n s」P D A ( 1 9 9 8 ) J P h a r m S c i T e c h n o l 5 2 : 2 3 8 - 3 1 1 も参照のこと。

#### 【 0 1 4 6 】

抗体の用量は、投与しようとする被験体の年齢及びサイズ、標的疾患、状態、投与経路などに依存して変わり得る。本発明の抗体が成人患者における疾患又は障害を処置するために使用される場合、本発明の抗体を通常、約 0 . 1 ~ 約 1 0 0 m g / 体重 k g の単回用量、より好ましくは約 5 ~ 約 8 0、約 1 0 ~ 約 7 0、又は約 2 0 ~ 約 5 0 m g / 体重 k g

10

20

30

40

50

の単回用量で投与することが有利である。状態の重症度に依存して、処置の頻度及び期間は調整され得る。特定の実施態様において、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントは、少なくとも約 0.1 mg ~ 約 800 mg、約 1 ~ 約 600 mg、約 5 ~ 約 500 mg、又は約 10 ~ 約 400 mg の初期用量で投与され得る。特定の実施態様において、初期用量に続いて、抗体又はその抗原結合フラグメントの第二又は複数のその後の用量が、初期用量とほぼ同じか又は初期用量より少ない量で投与され得、ここでその後の用量は、少なくとも 1 日 ~ 3 日；少なくとも 1 週、少なくとも 2 週；少なくとも 3 週；少なくとも 4 週；少なくとも 5 週；少なくとも 6 週；少なくとも 7 週；少なくとも 8 週；少なくとも 9 週；少なくとも 10 週；少なくとも 12 週；又は少なくとも 14 週だけ離される。

#### 【0147】

様々な送達系が公知であり、そして本発明の医薬組成物を投与するために使用され得る、例えば、リポソームでのカプセル化、マイクロパーティクル、マイクロカプセル、変異ウイルスを発現することができる組み換え細胞、受容体媒介エンドサイトーシス（例えば、Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262: 4429 - 4432 を参照のこと）。導入方法としては、限定されないが、皮内、経皮、筋内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、上皮及び経口経路が挙げられる。組成物は、いずれかの都合の良い経路、例えば注入又はボラス注射により、上皮又は粘膜裏層（例えば、口腔粘膜、直腸及び腸粘膜など）を通した吸収により投与され得、そして他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与され得る。投与は全身でも局所でもよい。医薬組成物は小胞、特にリポソームでも送達され得る（例えば、Langer (1990) Science 249: 1527 - 1533）。

#### 【0148】

本発明の抗体を送達するためのナノ粒子の使用もまた本明細書において検討される。抗体結合ナノ粒子は、治療適用及び診断適用の両方に使用され得る。抗体結合ナノ粒子並びに製造及び使用の方法は、Arruebo、M. らにより 2009 年に詳細に記載される（「Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications」 in J. Nanomat. Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389）（参照により本明細書に加入される）。ナノ粒子は、細胞を標的化するために開発され、そして医薬組成物中に含有される抗体に結合され得る。薬物送達のためのナノ粒子は、例えば US 8257740 又は US 8246995（それぞれその全体として本明細書に加入される）にも記載されている。

#### 【0149】

特定の状況において、医薬組成物は制御放出系で送達され得る。一実施態様において、ポンプが使用され得る。別の実施態様において、ポリマー材料が使用され得る。更に別の実施態様において、制御放出系は組成物の標的の近傍に置かれ得、従って全身投薬のほんの一部しか必要としない。

#### 【0150】

注射可能製剤は、静脈内、皮下、皮内、頭蓋内、腹腔内及び筋内注射、点滴などのための投薬形態を含み得る。これらの注射可能製剤は、公知の方法により製造され得る。例えば、注射可能製剤は、例えば、上記の抗体又はその塩を、従来に注射に使用される滅菌水性媒体又は油性媒体中に溶解、懸濁化又は乳化させることにより製造され得る。注射のための水性媒体としては、例えば、生理食塩水、グルコース及び他の補助剤を含有する等張液などがあり、これらは、アルコール（例えば、エタノール）、多価アルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤 [例えば、ポリソルベート 80、HCO-50（硬化ヒマシ油のポリオキシエチレン（50 mol）付加物）] などのような適切な可溶化剤と組み合わせて使用され得る。油性媒体としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが使用され、これらは安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどのような可溶化剤と組み合わせて使用され得る。このようにして製造された注射剤は、好ましくは適切なアンプルに充填される。

10

20

30

40

50

## 【0151】

本発明の医薬組成物は、標準的な針及びシリンジを用いて皮下又は静脈内に送達され得る。さらに、皮下送達に関して、ペン型送達デバイスは、本発明の医薬組成物の送達において容易に有用性を有する。このようなペン型送達デバイスは、再使用可能か又は使い捨てであり得る。再使用可能ペン型送達デバイスは、一般的に、医薬組成物を含有する交換可能なカートリッジを利用する。カートリッジ内の医薬組成物が全て投与されてカートリッジが空になると、空のカートリッジは容易に廃棄することができ、そして医薬組成物を含有する新しいカートリッジと交換される。その後ペン型送達デバイスは再使用され得る。使い捨てペン型送達デバイスには交換可能カートリッジはない。むしろ、使い捨てペン型送達デバイスは、デバイス内のリザーバ中に保持された医薬組成物を予め充填された状態である。リザーバから医薬組成物が空になると、デバイス全体が廃棄される。

10

## 【0152】

多数の再使用可能ペン型及び自動注射器送達デバイスが本発明の医薬組成物の皮下送達において有用性を有する。例としては、確かに限定されないが、少数の例を挙げると、AUTOPENTM (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK)、DISETRONICTM ペン (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25 TM ペン、HUMALOG TM ペン、HUMALIN 70/30 TM ペン (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN)、NOVOPENTMI、II 及び III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、NOVOPEN JUNIORTM (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、BD TM ペン (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、OPTIPENTM、OPTIPEN PRO TM、OPTIPEN STARLETTM、並びに OPTICLIKT M (Sanofi - Aventis, Frankfurt, Germany) が挙げられる。本発明の医薬組成物の皮下送達において有用性を有する使い捨て可能ペン型デバイスの例としては、確かに限定されないが、少数の例を挙げると、SOLOSTARTM ペン (Sanofi - Aventis)、FLEXPENTM (Novo Nordisk)、及び KWIKPENTM (Eli Lilly)、SURECLICKTM 自動注射器 (Amgen, Thousand Oaks, CA)、PENLETTM (Haselmeier, Stuttgart, Germany)、EPIPEN (Dey, L.P.) 及び HUMIRATM ペン (Abbott Labs, Abbott Park, IL) が挙げられる。

20

30

## 【0153】

有利には、上記の経口又は非経口用途のための医薬組成物は、活性成分の用量に合うように適合された単位用量で製造されて投薬形態となる。このような単位用量の投薬形態としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが挙げられる。含有される抗体の量は、一般的に単位用量の投薬形態あたり約 5 ～ 約 500 mg であり；特に注射剤の形態では、抗体は約 5 ～ 約 300 mg で含有されることが好ましく、そして他の投薬形態については約 10 ～ 約 300 mg で含有されることが好ましい。

## 【0154】

抗体の治療上の使用

本発明の抗体は、C5 に関連する疾患若しくは障害若しくは状態の処置及び／若しくは予防のため、又はこのような疾患、障害若しくは状態に伴う少なくとも少なくとも 1 つの症状を寛解させるために有用である。特定の実施態様において、本明細書の抗体又はその抗原結合フラグメントは、C5 に関連する疾患又は障害又は状態を有する患者に治療的用量で投与され得る。

40

## 【0155】

特定の実施態様において、本発明の抗体は、非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) の症状又は徴候を処置又は予防する際に有用である。aHUS の症状及び徴候としては、限定されないが、血小板活性化、溶血、脳卒中、心臓発作、腎不全及び／又は死亡に至る全身

50

性血栓性微小血管症（身体中の小血管における血餅の形成）、末期腎疾患、持続性腎損傷、腹痛、錯乱、浮腫、疲労、悪心／嘔吐、下痢、並びに微小血管症性貧血が挙げられる。

【 0 1 5 6 】

特定の実施態様において、本発明の抗体は、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）の症状又は徴候を処置又は予防する際に有用である。PNHの症状及び徴候としては、限定されないが、赤血球の破壊、血栓症（深部静脈血栓症、肺塞栓症を含む）、血管内溶血性貧血、尿の赤変、疲労、息切れ、及び動悸のような貧血の症状、腹痛並びに嚥下困難が挙げられる。

【 0 1 5 7 】

特定の実施態様において、本発明の抗体は、神経学的障害、腎障害、多発性硬化症、脳卒中、ギラン・バレー症候群、外傷性脳傷害、パーキンソン病、不適切又は望ましくない補体活性化の障害、血液透析合併症、超急性同種移植片拒絶、異種移植片拒絶、IL-2治療の間のインターロイキン-2誘導毒性、炎症性障害、自己免疫疾患の炎症、クローン病、成人呼吸促迫症候群、火傷又は凍傷を含む熱傷、虚血後再灌流状態、心筋梗塞、毛細管漏出症候群、肥満、糖尿病、アルツハイマー病、統合失調症、脳卒中、てんかん、アテローム性動脈硬化、血管炎、水疱性類天疱瘡、C3腎症（C3 glomerulopathy）、膜増殖性糸球体腎炎、バルーン血管形成術、心肺バイパス術又は腎動脈バイパス術におけるポンプ後（post-pump）症候群、血液透析、腎虚血、大動脈再建後の腸間膜動脈再灌流、感染性疾患又は敗血症、免疫複合体病及び自己免疫疾患、糖尿病性腎症、アルポート症候群、進行性腎不全、蛋白尿性腎臓病、腎虚血-再灌流傷害、ループス腎炎、糸球体症、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス（SLE）、SLE腎炎、膜性増殖性腎炎、溶血性貧血、視神経脊髄炎、腎移植、遺伝性CD59欠乏、乾癬、及び重症筋無力症からなる群より選択されるC5関連疾患又は障害の少なくとも1つの症状又は徴候を処置又は予防するために有用である。特定の他の実施態様において、本発明の抗体は、呼吸困難、喀血、ARDS、喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、肺気腫、肺塞栓症及び梗塞、肺炎、線維形成性粉塵疾患、不活性粉塵及び鉱物に起因する傷害（例えば、ケイ素、炭塵、ベリリウム、及びアスベスト）、肺線維症、有機粉塵疾患、化学的損傷（刺激性ガス及び化学物質、例えば、塩素、ホスゲン、二酸化硫黄、硫化水素、二酸化窒素、アンモニア、及び塩酸に起因する）、煙傷害、熱傷（例えば、火傷、凍傷）、喘息、アレルギー、気管支収縮、過敏性肺炎、寄生虫症、グッドパスチャー症候群、肺血管炎、遺伝性血管性浮腫、及び免疫複合体関連炎症のような肺の疾患及び障害からなる群より選択されるC5関連疾患又は障害の少なくとも1つの症状又は徴候を処置又は予防するために有用である。

【 0 1 5 8 】

特定の実施態様において、本発明の抗体は、加齢黄斑変性（AMD）、糖尿病黄斑浮腫（DME）、糖尿病性網膜症、眼内血管新生（脈絡膜、角膜又は網膜組織に影響を及ぼす眼内新血管形成）、地図状萎縮（GA）、ぶどう膜炎及び視神経脊髄炎のような眼疾患に罹患している被験体を処置するために有用である。本発明の抗体は、萎縮型（dry）AMD又は滲出型（wet）AMDの少なくとも1つの症状又は徴候を処置するか又は寛解させるために使用され得る。いくつかの実施態様において、本発明の抗体は、視力喪失を防止するか又は速度を遅くする際に有用である。一実施態様において、本発明の抗体は、萎縮型AMDを有する被験体の眼におけるドルーゼンを減少させる際に有用である。一実施態様において、本発明の抗体は、AMDを有する被験体における視力喪失を防止又は低減／遅延する際に有用である。

【 0 1 5 9 】

本発明の1つ又はそれ以上の抗体は、眼の疾患又は傷害の症状又は状態／徴候の1つ又はそれ以上の重症度を軽減するか又は予防するか又は減少させるために投与され得る。抗体は、視力喪失、視覚の歪み、低光量への適合の困難性、屈曲した中心視野、中心／全体視野のかすみ（haziness）の増加、ドルーゼンの存在（網膜上に蓄積する細胞外物質の小さな蓄積）、色素変化、変視症の形態での歪んだ視野（ここで直線の格子は波状の

10

20

30

40

50

ように見え、そして格子の一部は空白に見える)、滲出性変化(眼の出血、硬性白斑、網膜下/RPE下/網膜内液)、明るい光に曝露された後の視覚機能の遅い回復(光ストレス試験)、初発及び地図状萎縮、視力の急激な減少(2レベル又はそれ以上)、例えば、20/20から20/80、優先的超視野測定変化(preferential hyperacuity perimetry changes)(滲出性AMDについて)、かすみ目、中心視野の緩やかな喪失(非滲出性黄斑変性を有するものについて)、視野喪失の急速な開始(滲出性黄斑変性を有する被験体における異常血管の漏出及び出血によりしばしば引き起こされる)、中心暗点(影又は視野の欠損した領域)、色の区別の困難、特に暗色と暗色の区別及び明色と明色の区別、対比感度の喪失、Amsler格子において屈曲したように見える直線を含むがこれらに限定されない少なくとも1つの症状を寛解させるか又は重症度を減少させるために使用され得る。

10

#### 【0160】

50歳を超えた被験体、黄斑変性の家族歴がある被験体、喫煙者、及び肥満、高コレステロール、心臓血管疾患、又は不健康な食事を有する被験体のような、黄斑変性を発症する危険性がある被験体に、予防的に本発明の1つ又はそれ以上の抗体を使用することも本明細書において検討される。

#### 【0161】

本発明のさらなる実施態様において、本抗体は、C5に関連する疾患又は障害に罹患している患者を処置するための医薬組成物又は薬剤の製造のために使用される。本発明の別の実施態様において、本抗体は、C5に関連する疾患又は障害を処置するか又は寛解させるために有用である当業者に公知のいずれかの他の薬剤又はいずれかの他の治療とともに補助治療として使用される。

20

#### 【0162】

##### 組み合わせ治療

組み合わせ治療は、本発明の抗C5抗体、及び本発明の抗体と若しくは本発明の抗体の生物学的に活性なフラグメントと有利に組み合わせられ得るいずれかのさらなる治療剤を含み得る。本発明の抗体は、C5に関連する疾患又は障害を処置するために1つ又はそれ以上の薬物又は治療と相乗的に組み合わせられ得る。いくつかの実施態様において、本発明の抗体は、前記疾患の1つ又はそれ以上の症状を寛解させるために第二の治療剤と組み合わせられ得る。

30

#### 【0163】

C5関連疾患又は障害に依存して、本発明の抗体は1つ又はそれ以上のさらなる治療剤と組み合わせ使用され得、これらとしては、限定されないが、抗凝固薬(例えば、ワルファリン、アスピリン、ヘパリン、フェニンジオン、フォンダパリヌクス、イドラパリナックス、及びトロンピン阻害剤(例えば、アルガトロバン、レピルジン、ビバリルジン、又はダピガトラン)、抗炎症薬(例えば、コルチコステロイド類、及び非ステロイド抗炎症薬)、降圧薬(例えば、アンジオテンシン変換酵素阻害剤)、免疫抑制剤(例えば、ビンクリスチン、シクロスポリンA、又はメトトレキサート)、線維素溶解剤(例えば、アンクロッド、 $\alpha$ -アミノカプロン酸、抗プラスミン-a<sub>1</sub>、プロスタサイクリン、及びデフィプロチド)、ヒドロキシメチルグルタリルCoA還元酵素の阻害剤のような脂質低下剤、リツキシマブのような抗CD20薬、インフリキシマブのような抗TNF薬、抗けいれん薬(例えば、硫酸マグネシウム)、C3阻害剤、又は抗血栓薬が挙げられる。

40

#### 【0164】

特定の実施態様において、第二の治療剤はC5タンパク質に対する別の抗体である。C5に対する広い中和又は阻害活性を有する抗体の組み合わせ(「カクテル」)の使用は本明細書において検討される。いくつかの実施態様において、非競合抗体は、それを必要とする被験体に組み合わせられて投与され得る。いくつかの実施態様において、その組み合わせを構成する抗体は、タンパク質状の異なる重なっていないエピトープに結合する。組み合わせを構成する抗体は、C5のC5転換酵素への結合を遮断し得、かつ/又はC5のC5a及びC5bへの切断を防止/阻害し得る。特定の実施態様において、第二の抗体はヒト

50

血清中でより長い半減期を有し得る。

【 0 1 6 5 】

本明細書に記載される用語「～と組み合わせる」は、さらなる治療活性成分が、本発明の抗 C 5 抗体の投与の前、抗 C 5 抗体の投与と同時、又は抗 C 5 抗体の投与後に投与され得ることを意味する。用語「～と組み合わせる」はまた抗 C 5 抗体及び第二の治療剤の連続的又は同時の投与も含む。

【 0 1 6 6 】

さらなる治療活性成分は、本発明の抗 C 5 抗体の投与の前に被験体に投与され得る。例えば、第一の成分は、第一の成分が第二の成分の投与の 1 週間前、7 2 時間前、6 0 時間前、4 8 時間前、3 6 時間前、2 4 時間前、1 2 時間前、6 時間前、5 時間前、4 時間前、3 時間前、2 時間前、1 時間前、3 0 分前、1 5 分前、1 0 分前、5 分前、又は 1 分未満前に投与される場合に、第二の成分「の前に」投与されるとみなされ得る。他の実施態様において、さらなる治療活性成分は、本発明の抗 C 5 抗体の投与の後に被験体に投与され得る。例えば、第一の成分は、第一の成分が第二の成分の投与の 1 分後、5 分後、1 0 分後、1 5 分後、3 0 分後、1 時間後、2 時間後、3 時間後、4 時間後、5 時間後、6 時間後、1 2 時間後、2 4 時間後、3 6 時間後、4 8 時間後、6 0 時間後、7 2 時間後に投与される場合に、第二の成分「の後に」投与されるとみなされ得る。更に他の実施態様において、さらなる治療活性成分は、本発明の抗 C 5 抗体の投与と同時に被験体に投与され得る。本発明の目的のための「同時」投与は、例えば、抗 C 5 抗体及びさらなる治療活性成分は、単一の投薬形態で、又は互いに約 3 0 分若しくはそれ以下以内に被験体に投与される別々の投薬形態での被験体への投与を含む。別々の投薬形態で投与される場合、各投薬形態は、同じ経路を介して投与され得（例えば、抗 C 5 抗体及びさらなる治療活性成分の両方が静脈内投与などされ得る）；あるいは、各投薬形態は異なる経路で投与され得（例えば、抗 C 5 抗体が静脈内投与され得、そしてさらなる治療活性成分は経口投与され得る）。いずれにしても、単一投薬形態、同じ経路による別々の投薬形態、又は異なる経路による別々の投薬形態は、本開示の目的のために全て「同時投与」とみなされる。本開示の目的のために、さらなる治療活性成分の投与の「前」、「同時」又は「後」（本明細書の上で定義される用語と同様）の抗 C 5 抗体の投与は、さらなる治療活性成分「と組み合わせる」抗 C 5 抗体の投与とみなされる。

【 0 1 6 7 】

本発明は、本発明の抗 C 5 抗体が、本明細書の他所に記載されるようにさらなる治療活性成分の 1 つ又はそれ以上と同時に処方される（c o - f o r m u l a t e d）医薬組成物を含む。

【 0 1 6 8 】

投与レジメン

特定の実施態様によれば、本発明の抗 C 5 抗体（又は抗 C 5 抗体と本明細書において言及されるさらなる治療活性薬剤のいずれかとの組み合わせを含む医薬組成物）の単回用量は、それを必要とする被験体に投与され得る。本発明の特定の実施態様によれば、抗 C 5 抗体（又は抗 C 5 抗体と本明細書において言及されるさらなる治療活性薬剤のいずれかとの組み合わせを含む医薬組成物）の複数回用量は、規定された時間経過にわたって被験体に投与され得る。本発明のこの局面に従う方法は、複数回用量の本発明の抗 C 5 抗体を被験体に連続して投与することを含む。本明細書において使用される「連続的に投与すること」は、各用量の抗 C 5 抗体が、異なる時点に、例えば所定の間隔（例えば、時間、日、週、又は月）だけ離れた異なる日に被験体に投与されることを意味する。本発明は、単回初期用量の抗 C 5 抗体、続いて 1 又はそれ以上の二次用量の抗 C 5 抗体、そして場合により続いて 1 又はそれ以上の三次用量の抗 C 5 抗体を患者に連続的に投与することを含む方法を含む。

【 0 1 6 9 】

用語「初期用量」、「二次用量」、及び「三次用量」は、本発明の抗 C 5 抗体の投与の時間的順序を指す。したがって、「初期用量」は処置レジメンの初めに投与される用量であ

り（「ベースライン用量」とも呼ばれる）；「二次用量」は初期用量の後に投与される用量であり；そして「三次用量」は、二次用量の後に投与される用量である。初期、二次、及び三次用量は、全て同じ量の抗 C 5 抗体を含有していてもよいが、一般に投与頻度に関して互いに異なり得る。しかし、特定の実施態様において、初期、二次及び / 又は三次用量中に含有される抗 C 5 抗体の量は、処置の経過の間互いに異なる（例えば、必要に応じて上下に調整される）。特定の実施態様において、2 又はそれ以上（例えば、2、3、4、又は 5）の用量が、「ローディング用量」として処置レジメンの初めに投与され、続いてその後の用量がより少ない頻度で投与される（例えば、「維持量」）。

#### 【0170】

本発明の例となる実施態様によれば、各二次及び / 又は三次用量は、直前の投薬の 1 ~ 48（例えば、1、 $1^1/2$ 、2、 $2^1/2$ 、3、 $3^1/2$ 、4、 $4^1/2$ 、5、 $5^1/2$ 、6、 $6^1/2$ 、7、 $7^1/2$ 、8、 $8^1/2$ 、9、 $9^1/2$ 、10、 $10^1/2$ 、11、 $11^1/2$ 、12、 $12^1/2$ 、13、 $13^1/2$ 、14、 $14^1/2$ 、15、 $15^1/2$ 、16、 $16^1/2$ 、17、 $17^1/2$ 、18、 $18^1/2$ 、19、 $19^1/2$ 、20、 $20^1/2$ 、21、 $21^1/2$ 、22、 $22^1/2$ 、23、 $23^1/2$ 、24、 $24^1/2$ 、25、 $25^1/2$ 、26、 $26^1/2$ 、又はそれ以上）時間後に投与される。本明細書で使用する句「直前の用量」は、複数回投与の順序で、介在する投与がなくその順序ですぐ次の用量の投与の前に患者に投与される抗 C 5 抗体の用量を意味する。

#### 【0171】

本発明のこの局面に従う方法は、いずれかの数の二次及び / 又は三次用量の抗 C 5 抗体を患者に投与することを含み得る。例えば、特定の実施態様において、単回のみ二次用量が患者に投与される。他の実施態様において、2 又はそれ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、又はそれ以上）の二次用量が患者に投与される。同様に、特定の実施態様において、単回のみ三次用量が患者に投与される。他の実施態様において、2 又はそれ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、又はそれ以上）の三次用量が患者に投与される。

#### 【0172】

本発明の特定の実施態様において、二次及び / 又は三次用量が患者に投与される頻度は、処置レジメンの間に変わり得る。投与頻度はまた、臨床検査後に個々の患者の必要によって医師により処置の間に調整され得る。

#### 【0173】

抗体の診断上の使用

本発明の抗 C 5 抗体は、例えば診断目的のために、サンプル中の C 5 を検出及び / 又は測定するために使用され得る。いくつかの実施態様は、C 5 関連疾患又は障害を検出するためのアッセイにおいて本発明の 1 つ又はそれ以上の抗体の使用を検討する。C 5 についての例となる診断アッセイは、例えば、患者から得られたサンプルを本発明の抗 C 5 抗体と接触させることを含み、ここで抗 C 5 抗体は、検出可能な標識若しくはレポーター分子で標識されるか、又は患者のサンプルから C 5 を選択的に単離するための捕捉リガンドとして使用される。あるいは、非標識抗 C 5 抗体は、それ自体検出可能に標識された二次抗体と組み合わせて診断適用において使用され得る。検出可能な標識又はレポーター分子は、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、若しくは  $^{125}\text{I}$  のような放射性同位体；フルオレセインイソチオシアネート若しくはローダミンのような蛍光若しくは化学発光部分；又はアルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、若しくはルシフェラーゼのような酵素であり得る。サンプル中の C 5 を検出又は測定するために使用することができる具体的な例となるアッセイとしては、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、及び蛍光標識細胞分取（FACS）が挙げられる。

#### 【0174】

本発明に従う C 5 診断アッセイにおいて使用され得るサンプルは、患者から得ることができるいずれかの組織又は流体サンプルを含み、これは正常又は病的状態下での検出可能な

量の C 5 タンパク質又はそのフラグメントのいずれかを含有する。一般に、健常患者（例えば、C 5 に関連する疾患を罹患していない患者）から得られる特定のサンプル中の C 5 タンパク質のレベルは、C 5 のベースライン又は標準レベルを最初に確立するために測定される。ついで C 5 のこのベースラインレベルは、C 5 に関連する状態又はこのような状態に関連する症状を有することが疑われる個体から得られたサンプルにおいて測定された C 5 レベルに対して比較され得る。

【 0 1 7 5 】

C 5 タンパク質に対して特異的な抗体は、さらなる標識若しくは部分を含有していなくてもよく、又はそれらは N 末端若しくは C 末端標識若しくは部分を含有し得る。一実施態様において、標識又は部分はビオチンである。結合アッセイにおいて、標識の位置（もしあれば）は、ペプチドが結合される表面に対してペプチドの方向性を決定し得る。例えば、表面がアビジンで被覆される場合、N 末端ビオチンを含有するペプチドは、ペプチドの C 末端部分が表面に対して遠位になるように方向付けられる。

10

【 0 1 7 6 】

選択された実施態様

本開示の選択された実施態様は以下を含む：

実施態様 1 において、本発明は補体因子 5（C 5）タンパク質に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、ここで抗体又はその抗原結合フラグメントは、水素 / 重水素交換により決定して、C 5（配列番号 3 5 9）内に含有される 1 つ又はそれ以上のアミノ酸と相互作用する。

20

【 0 1 7 7 】

実施態様 2 において、本発明は、抗体又はその抗原結合フラグメントが、水素 / 重水素交換により決定して、C 5 のアルファ鎖及び / 又はベータ鎖内に含有される 1 つ又はそれ以上のアミノ酸と相互作用する、実施態様 1 の抗原結合フラグメントの単離された抗体を含む。

【 0 1 7 8 】

実施態様 3 において、本発明は抗体又はその抗原結合フラグメントが、水素 / 重水素交換により決定して、C 5 の C 5 a アナフィラトキシン領域のアミノ酸と相互作用しない、実施態様 1 又は 2 の抗原結合フラグメントの単離された抗体を含む。

【 0 1 7 9 】

実施態様 4 において、本発明は、抗体又はその抗原結合フラグメントが、水素 / 重水素交換により決定して、配列番号 3 6 0 及び / 又は配列番号 3 6 1 内に含有される 1 つ又はそれ以上のアミノ酸と相互作用する、実施態様 1 ~ 3 のいずれか 1 つの抗原結合フラグメントの単離された抗体を含む。

30

【 0 1 8 0 】

実施態様 5 において、本発明は、抗体又はその抗原結合フラグメントが、（ a ）配列番号 3 5 9 のアミノ酸 5 9 1 ~ 5 9 9 ；（ b ）配列番号 3 5 9 のアミノ酸 5 9 3 ~ 5 9 9 ；（ c ）配列番号 3 5 9 のアミノ酸 7 7 5 ~ 7 8 7 ；（ d ）配列番号 3 5 9 のアミノ酸 7 7 5 ~ 7 9 4 ；及び（ e ）配列番号 3 5 9 のアミノ酸 7 7 9 ~ 7 8 7 からなる群より選択されるアミノ酸配列と相互作用する、実施態様 1 ~ 4 のいずれか 1 項の単離された抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。

40

【 0 1 8 1 】

実施態様 6 において、本発明は、抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号 3 6 0 及び 3 6 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列内に含有される少なくとも 5 つのアミノ酸と相互作用する、実施態様 1 ~ 5 のいずれか 1 つの単離された抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。

【 0 1 8 2 】

実施態様 7 において、本発明は、抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号 3 6 0 及び 3 6 1 のアミノ酸配列と相互作用する、実施態様 1 ~ 5 のいずれか 1 つの単離された抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。

50



## 【 0 1 8 3 】

実施態様 8 において、本発明は、補体因子 5 ( C 5 ) タンパク質に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、ここで抗体又はその抗原結合フラグメントは、以下のアミノ酸残基の少なくとも 1 つと相互作用する：配列番号 3 5 9 の N 5 9 1、M 5 9 2、A 5 9 3、T 5 9 4、G 5 9 5、M 5 9 6、D 5 9 7、S 5 9 8、W 5 9 9、W 7 7 5、E 7 7 6、V 7 7 7、H 7 7 8、L 7 7 9、V 7 8 0、P 7 8 1、R 7 8 2、R 7 8 3、K 7 8 4、Q 7 8 5、L 7 8 6、Q 7 8 7、F 7 8 8、A 7 8 9、L 7 9 0、P 7 9 1、D 7 9 2、S 7 9 3、又は L 7 9 4。

## 【 0 1 8 4 】

実施態様 9 において、本発明は、抗体が以下の特徴のうちの 1 つ又はそれ以上を有する、実施態様 1 ~ 8 のいずれか 1 つの単離された抗体又はその抗原結合フラグメントを含む：( a ) カニクイザルへの投与の際に 7 0 日目まで  $10 \mu\text{g} / \text{mL}$  より高い血清濃度を有する；( b ) エクスビボ溶血アッセイにおいて測定して、カニクイザルへの投与の際に 3 5 日目まで古典的経路 ( C P ) 溶血を遮断する；( c ) エクスビボ溶血アッセイにおいて測定して、カニクイザルへの投与の際に 3 5 日目まで代替経路 ( A P ) 溶血を遮断する；( d ) カニクイザルにおいて 1 0 日より長い血清半減期を有する；( e ) C 5 ヒト化マウスへの投与の際に 4 0 日目まで  $10 \mu\text{g} / \text{mL}$  より高い血清濃度を有する；( f ) エクスビボ溶血アッセイにおいて測定して、C 5 ヒト化マウスへの投与の際に 3 0 日目まで C P 溶血を遮断する；及び( g ) C 5 ヒト化マウスにおいて 1 0 日より長い血清半減期を有する。

## 【 0 1 8 5 】

実施態様 1 0 において、本発明は、抗体が、以下からなる群より選択されるさらなる特徴を有する、実施態様 1 ~ 9 のいずれか 1 つの単離された抗体又はその抗原結合フラグメントを含む：( a ) 完全ヒトモノクローナル抗体である；( b ) 表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定して、2 5 で  $0.9 \text{ nM}$  未満の解離定数 (  $K_D$  ) でヒト C 5 に結合する；( c ) 表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定して、3 7 で  $0.3 \text{ nM}$  未満の  $K_D$  でヒト C 5 に結合する；( d ) 表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定して、6 5  $\text{nM}$  未満の  $K_D$  でサル C 5 に結合する；( e ) 表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定して、0 . 5  $\text{nM}$  未満の  $K_D$  でヒト C 5 変異体 R 8 8 5 H ( 配列番号 3 5 6 ) に結合する；( f ) 表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定して、0 . 5  $\text{nM}$  未満の  $K_D$  でヒト C 5 変異体 R 8 8 5 C ( 配列番号 3 5 7 ) に結合する；( g ) C P 溶血アッセイにおいて測定して、6  $\text{nM}$  未満の  $\text{IC}_{50}$  でヒト C 5 媒介古典的経路 ( C P ) 溶血を 9 5 % より多く遮断する；( h ) A P 溶血アッセイにおいて測定して、1 6 5  $\text{nM}$  未満の  $\text{IC}_{50}$  でヒト C 5 媒介代替経路 ( A P ) 溶血を 7 0 % より多く遮断する；( i ) C P 溶血アッセイにおいて測定して、1 8 5  $\text{nM}$  未満の  $\text{IC}_{50}$  でアフリカミドリザル C 5 媒介 C P 溶血を阻害する；( j ) A P 溶血アッセイにおいて測定して、2 3 5  $\text{nM}$  未満の  $\text{IC}_{50}$  でアフリカミドリザル C 5 媒介 A P 溶血を阻害する；( k ) C P 溶血アッセイにおいて測定して、1 4 5  $\text{nM}$  未満の  $\text{IC}_{50}$  でカニクイザル C 5 媒介 C P 溶血を阻害する；及び( l ) A P 溶血アッセイにおいて測定して、3 0  $\text{nM}$  未満の  $\text{IC}_{50}$  でカニクイザル C 5 媒介 A P 溶血を阻害する。

## 【 0 1 8 6 】

実施態様 1 1 において、本発明は、実施態様 1 ~ 1 0 のいずれか 1 つの単離された抗体又は抗原結合フラグメントを含み、ここで、抗体又は抗原結合フラグメントは、表 1 に列挙される重鎖可変領域 ( H C V R ) 配列のいずれか 1 つ内に含有される 3 つの重鎖相補性決定領域 ( C D R ) ( H C D R 1、H C D R 2 及び H C D R 3 )；及び表 1 に列挙される軽鎖可変領域 ( L C V R ) 配列のいずれか 1 つ内に含有される 3 つの軽鎖 C D R ( L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 ) を含む。

## 【 0 1 8 7 】

実施態様 1 2 において、本発明は：( a ) 配列番号 4、2 0、3 6、5 2、6 8、8 4、1 0 0、1 2 4、1 4 0、1 4 8、1 5 6、1 7 2、1 8 8、2 0 4、2 2 0、2 3 6、2 5 2、2 6 8、2 7 6、2 9 2、3 0 8、3 2 4、及び 3 4 0 からなる群より選択され

10

20

30

40

50

るアミノ酸配列を有するHCDR1ドメイン；(b)配列番号6、22、38、54、70、86、102、126、142、150、158、174、190、206、222、238、254、270、278、294、310、326、及び342からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するHCDR2ドメイン；(c)ドメイン配列番号8、24、40、56、72、88、104、128、144、152、160、176、192、208、224、240、256、272、280、296、312、328、及び344からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するHCDR3ドメイン；(d)配列番号12、28、44、60、76、92、108、116、132、164、180、196、212、228、244、260、284、300、316、332、及び348からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するLCDR1ドメイン；(e)配列番号14、30、46、62、78、94、110、118、134、166、182、198、214、230、246、262、286、302、318、334、及び350からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するLCDR2ドメイン；並びに(f)配列番号16、32、48、64、80、96、112、120、136、168、184、200、216、232、248、264、288、304、320、336、及び352からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するLCDR3ドメインを含む、実施例1～11のいずれか1つの単離された抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。

10

#### 【0188】

実施態様13において、本発明は、表1に列挙されるHCVR配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するHCVRを含む、実施態様1～12のいずれか1つの単離された抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。

20

#### 【0189】

実施態様14において、本発明は、表1に列挙されるLCVR配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するLCVRを含む、実施態様13の単離された抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。

#### 【0190】

実施態様15において、本発明は、配列番号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、及び338/346からなる群より選択されるHCVR/LCVRアミノ酸配列対を含む、実施態様11～14のいずれか1つの単離された抗体又は抗原結合フラグメントを含む。

30

#### 【0191】

実施態様16において、本発明は、配列番号50、98、138、及び202からなる群より選択されるHCVR内に含有される3つのCDR；並びに配列番号58、106、及び210からなる群より選択されるLCVR内に含有される3つのCDRを含む、実施態様11～15のいずれか1つの単離された抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。

#### 【0192】

40

実施態様17において、本発明は：(a)配列番号52、54、56、60、62、及び64；(b)配列番号100、102、104、108、110、及び112；(c)配列番号140、142、144、108、110、及び112；並びに(d)配列番号204、206、208、212、214、及び216からなる群より選択されるCDRを含む、実施態様16の単離された抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。

#### 【0193】

実施態様18において、本発明は、配列番号50/58、98/106、138/106、及び202/210からなる群より選択されるHCVR/LCVRアミノ酸配列対を含む、実施態様17の単離された抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。

#### 【0194】

50

実施態様 19 において、本発明は、C 5 への結合について実施態様 17 の抗体又は抗原結合フラグメントと競合する抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。

【0195】

実施態様 20 において、本発明は、実施態様 17 の抗体又は抗原結合フラグメントと同じエピトープに結合する抗体又は抗原結合フラグメントを含む。

【0196】

実施態様 21 において、本発明は、5 以下のアミノ酸置換を有する表 1 に列挙されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、実施態様 9 又は 10 の抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。

【0197】

実施態様 22 において、本発明は、5 以下のアミノ酸置換を有する表 1 に列挙されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、実施態様 21 の抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。

【0198】

実施態様 23 において、本発明は、配列番号 98 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する重鎖可変領域を含む、実施態様 9 又は 10 の抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。

【0199】

実施態様 24 において、本発明は、配列番号 106 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む、実施態様 23 の抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。

【0200】

実施態様 25 において、本発明は、H C V R の 3 つの C D R [ここで H C V R は、配列番号 2、18、34、50、66、82、98、122、138、146、154、170、186、202、218、234、250、266、274、290、306、322、及び 338 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する]；及び L C V R の 3 つの C D R、[ここで L C V R は、配列番号 10、26、42、58、74、90、106、114、130、162、178、194、210、226、242、258、282、298、314、330、及び 346 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する]を含む、C 5 a 及び C 5 b への C 5 切断を遮断する単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。

【0201】

実施態様 26 において、本発明は、実施態様 1 ~ 25 のいずれか 1 つに従う C 5 に結合する単離された抗体又はその抗原結合フラグメント、及び薬学的に許容しうる担体又は希釈剤を含む医薬組成物を含む。

【0202】

実施態様 27 において、本発明は、実施態様 1 ~ 25 のいずれか 1 つに示される抗体の H C V R をコードするポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を含む。

【0203】

実施態様 28 において、本発明は、実施態様 1 ~ 25 のいずれか 1 つに示される抗体の L C V R をコードするポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を含む。

【0204】

実施態様 29 において、本発明は実施態様 27 又は 28 のポリヌクレオチド配列を含むベクターを含む。

【0205】

実施態様 30 において、本発明は実施態様 29 のベクターを発現する細胞を含む。

【0206】

実施態様 31 において、本発明は、C 5 に関連する疾患又は障害の少なくとも 1 つの症状又は徴候を予防するか、処置するか又はさせる方法を含み、該方法は、実施態様 1 ~ 25 のいずれか 1 つの抗体又は抗原結合フラグメントを、それを必要とする被験体に投与する

10

20

30

40

50

ことを含む。

【 0 2 0 7 】

実施態様 3 2 において、本発明は、疾患又は障害が、非典型溶血性尿毒症症候群 ( a H U S )、発作性夜間ヘモグロビン尿症 ( P N H )、加齢性黄斑変性、地図状萎縮、ぶどう膜炎、視神経脊髄炎、多発性硬化症、脳卒中、ギラン・バレー症候群、外傷性脳損傷、パーキンソン病、不適切又は望ましくない補体活性化の障害、血液透析合併症、超急性同種移植片拒絶、異種移植片拒絶、I L - 2 治療の間のインターロイキン - 2 誘導毒性、炎症性障害、自己免疫疾患の炎症、クローン病、成人呼吸促迫症候群、火傷又は凍傷を含む熱傷、虚血後再灌流状態、心筋梗塞、毛細管漏出症候群、肥満、糖尿病、アルツハイマー病、統合失調症、脳卒中、てんかん、アテローム性動脈硬化、血管炎、水疱性類天疱瘡、C 3 腎症、膜増殖性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、アルポート症候群、進行性腎不全、蛋白尿性腎臓病、腎虚血 - 再灌流傷害、ループス腎炎、バルーン血管形成術、心肺バイパス術又は腎動脈バイパス術におけるポンプ後症候群、血液透析、腎虚血、大動脈再建後の腸間膜動脈再灌流、感染性疾患又は敗血症、免疫複合体病及び自己免疫疾患、腎障害、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス ( S L E )、S L E 腎炎、増殖性腎炎、溶血性貧血、喘息、慢性閉塞性肺疾患 ( C O P D )、肺気腫、肺塞栓症及び梗塞、肺炎、並びに重症筋無力症からなる群より選択される、実施態様 3 1 の方法を含む。

10

【 0 2 0 8 】

実施態様 3 3 において、本発明は、疾患又は障害が a H U S である実施態様 3 1 の方法を含む。

20

【 0 2 0 9 】

実施態様 3 4 において、本発明は、疾患又は障害が P N H である実施態様 3 1 の方法を含む。

【 0 2 1 0 】

実施態様 3 5 において、本発明は、医薬組成物がそれを必要とする被験体に予防的又は治療的に投与される、実施態様 3 1 ~ 3 4 のいずれか 1 つの方法を含む。

【 0 2 1 1 】

実施態様 3 6 において、本発明は、医薬組成物が第二の治療剤と組み合わせて投与される、実施態様 3 1 ~ 3 5 のいずれか 1 つの方法を含む。

【 0 2 1 2 】

実施態様 3 7、本発明は、抗凝固薬、抗炎症薬、降圧薬、免疫抑制剤、脂質低下剤、リツキシマブのような抗 C D 2 0 薬、インフリキシマブのような抗 T N F 薬、抗てんかん薬、C 3 阻害剤、第二の抗 C 5 抗体、及び抗血栓剤からなる群より選択される、実施態様 3 6 の方法を含む。

30

【 0 2 1 3 】

実施態様 3 8 において、本発明は、医薬組成物が、皮下、静脈内、皮内、腹腔内、経口、筋内、又は頭蓋内に投与される、実施態様 3 1 ~ 3 7 のいずれか 1 つの方法を含む。

【 実施例 】

【 0 2 1 4 】

以下の実施例は、本発明の方法及び組成物を製造し使用する方法の完全な開示及び記載を当業者に提供するように示されるものであり、本発明者らが彼らの発明とみなす範囲を限定することは意図されない。使用される数値 ( 例えば、量、温度など ) に関して正確性を確実にするために努力がなされたが、いくつかの実験誤差及び偏差が占めるはずである。特に示されていないならば、部数は質量部であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏度であり、室温は約 2 5 であり、そして圧力は大気圧又は大気圧付近である。

40

【 0 2 1 5 】

実施例 1 : 補体因子 5 ( C 5 ) タンパク質に対するヒト抗体の生成

C 5 タンパク質に対するヒト抗体を、ヒト免疫グロブリン重鎖及びカッパ軽鎖可変領域をコードする DNA を含む V E L O C I M M U N E ( R ) マウスにおいて生成した。血清精製ヒト C 5 タンパク質 ( C a l b i o c h e m カタログ番号 2 0 - 4 8 8 8 ) を用いて

50

マウスを免疫した。

【 0 2 1 6 】

抗体免疫応答を C 5 特異的免疫アッセイによりモニタリングした。所望の免疫応答が達成された場合、脾細胞を採取し、そしてマウス骨髄腫細胞と融合させてそれらの生存能を保存し、そしてハイブリドーマ細胞株を形成した。ハイブリドーマ細胞株を、スクリーニングそして選択して、C 5 特異的抗体を産生する細胞株を同定した。これらの細胞株を使用して、いくつかの抗 C 5 キメラ抗体（すなわち、ヒト可変ドメイン及びマウス定常ドメインを有する抗体）を得た；この方法で生成された例となる抗体を H 2 M 1 1 6 8 3 N 及び H 2 M 1 1 6 8 6 N と名付けた。

【 0 2 1 7 】

また抗 C 5 抗体を、米国特許第 7 5 8 2 2 9 8 号（参照によりその全体として本明細書に具体的に加入される）に記載されるように、骨髄腫細胞に融合することなく抗原陽性マウス B 細胞から直接単離した。この方法を使用して、いくつかの完全ヒト抗 C 5 抗体（すなわち、ヒト可変ドメイン及びヒト定常ドメインを有する抗体）を得た；この方法で生成された例となる抗体を、H 4 H 1 2 1 5 9 P、H 4 H 1 2 1 6 1 P、H 4 H 1 2 1 6 3 P、H 4 H 1 2 1 6 4 P、H 4 H 1 2 1 6 6 P、H 4 H 1 2 1 6 7 P、H 4 H 1 2 1 6 8 P、H 4 H 1 2 1 6 9 P、H 4 H 1 2 1 7 0 P、H 4 H 1 2 1 7 1 P、H 4 H 1 2 1 7 5 P、H 4 H 1 2 1 7 6 P 2、H 4 H 1 2 1 7 7 P 2 及び H 4 H 1 2 1 8 3 P 2 と指定した。

【 0 2 1 8 】

この実施例の方法に従って生成された例となる抗体の生物学的特性を、以下に示される実施例において詳細に記載する。

【 0 2 1 9 】

実施例 2：重鎖及び軽鎖可変領域アミノ酸及び核酸配列

表 1 は、本発明の選択された抗 C 5 抗体の重鎖及び軽鎖可変領域並びに C D R のアミノ酸配列識別子を示す。

【 0 2 2 0 】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1 : アミノ酸配列識別子

| 抗体記号表示      | 配列番号 |       |       |       |      |       |       |       |
|-------------|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
|             | 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   |

【 0 2 2 1 】

対応する核酸配列識別子を表 2 に示す。

【 0 2 2 2 】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2：核酸配列識別子

| 抗体記号表示      | 配列番号 |       |       |       |      |       |       |       |
|-------------|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
|             | HCVR | HCDR1 | 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   |

## 【0223】

抗体は、本明細書において典型的には以下の命名法に従って言及される：Fc 接頭語（例えば、「H4H」、「H2M」など）、続いて数字識別子（例えば、表 2 に示されるような「11686」、「12166」、「12183」など）、続いて「P」、「P2」、又は「N」接尾語。従って、この命名法によれば、抗体は、本明細書では例えば、「H2M11686N」、「H4H12183P2」、「H4H12168P」などと呼ばれ得る。本明細書において使用される抗体記号表示での H4H 及び H2M 接頭語は、抗体の特定の Fc 領域アイソタイプを示す、例えば、「H4H」抗体は、二量体安定化を促進するためにヒンジ領域にセリンからプロリンへの変異（S108P）を含むヒト IgG4 を有

し、そして「H2M」抗体は、マウスIgG2Fc(a又はbアイソタイプ)を有する(全ての可変領域は抗体記号表示において最初に「H」と示される完全ヒトである)。当業者には当然のことながら、特定のFcアイソタイプを有する抗体は、異なるFcアイソタイプに転換され得る(例えば、マウスIgG1Fcを有する抗体は、ヒトIgG4を有する抗体などに転換され得る)が、いずれにしても、可変ドメイン(CDRを含む) - これらは表2に示される数値識別子により示される - は同じままであり、そして抗原に対する結合特性は、Fcドメインの性質にかかわらず同一であるか又は実質的に同様であると期待される。

#### 【0224】

特定の実施態様において、マウスIgG1Fcを有する選択された抗体を、ヒトIgG4Fcを有する抗体に転換した。一実施態様において、IgG4FcドメインはUS20100331527に開示される2又はそれ以上のアミノ酸変化を含む。

10

#### 【0225】

変異した抗体を生成するために、H4H12166Pの相補性決定領域(CDR)における様々な残基をヒスチジンに変異させ、H4H12166P2~H4H12166P10として同定される9つの変異した抗体を生成した。CDRにおけるヒスチジン変異は、標的抗原に対する結合のpH依存性を付与することが示されており、改善された薬物動態をもたらす(Igawa et al., 2010, Nat. Biotechnol., 28: 1203-1207)。

#### 【0226】

20

以下の実施例において使用された対照構築物

以下の対照構築物(抗C5抗体)を、比較の目的のために本明細書に開示される実験に含めた: 「対照薬1」、米国特許第6,355,245号(Alexion Pharmaceuticals, Inc.)に従う抗体「h5G1.1」のV<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>配列を有するヒトC5に対するモノクローナル抗体; 及び「対照薬2」、米国特許出願公開第2013/0022615号(Novartis)に従う抗体「8109」のV<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>配列を有するヒトC5に対するヒトモノクローナル抗体。

#### 【0227】

実施例3: 表面プラズモン共鳴により決定したC5への抗体の結合

精製された抗C5抗体へのC5結合についての平衡解離定数(K<sub>D</sub>値)を、Biacore T200機器で実時間表面プラズモン共鳴バイオセンサーアッセイを使用して決定した。ヒトFc定常領域を有する発現された抗C5抗体を捕捉するために、Biacoreセンサー表面を、アミンカップリングによりモノクローナルマウス抗ヒトFc抗体(GE Healthcare、番号BR-1008-39)で誘導体化した。Biacore結合試験を、HBSTランニングバッファ(0.01M HEPES pH 7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.05%体積/体積 Surfactant P20)中で行った。ヒトC5を商業的供給源(EMD)から入手した。C末端myc-myc-ヘキサヒスチジンタグを有する他のC5試薬を発現させた(以後C5-mmhと呼ぶ)。アルギニン885においてヒスチジン及びシステイン点変異を含有するヒトC5-mmh試薬も発現させた(以後それぞれC5 R885H-mmh及びC5 R885C-mmhと呼ぶ)。HBSTランニングバッファ中で調製した様々な濃度のヒトC5、ヒトC5 R885H-mmh(配列番号356)、ヒトC5 R885C-mmh(配列番号357)及びサルC5-mmh(配列番号358)(100nM~1.23nMの範囲に及び、3倍希釈)を、抗C5抗体捕捉表面上に30μL/分の流速で注入した。捕捉されたモノクローナル抗体のそれぞれへの全C5試薬の結合を3分間モニタリングし、そしてHBSTランニングバッファ中のそれらの解離を8分間モニタリングした。全ての結合動力学実験を25又は37のいずれかでを行った。動力学結合(k<sub>a</sub>)及び解離(k<sub>d</sub>)速度定数を、実時間センサーグラムを1;1結合モデルに対してScrubber 2.0c曲線フィッティングソフトウェアを使用してフィッティングさせることにより決定した。結合解離平衡定数(K<sub>D</sub>)及び解離半減期(t<sub>1/2</sub>)を、動力学的速度定数から:

30

40

50



$K_D (M) = k_d / k_a$  及び  $t_{1/2} (分) = \ln 2 / (60 \times k_d)$  として計算した。

【 0 2 2 8 】

25 及び 37 での抗 C5 抗体へのヒト C5 結合についての結合動力学パラメーターを表 3 及び 4 に示す。

【 0 2 2 9 】

【 表 3 】

表 3 : 25℃でのヒト C5 への抗 C5 モノクローナル抗体の結合動力学パラメーター

| 抗体          | 捕捉された<br>抗体の量<br>(RU) | 100nM 結合<br>したヒト<br>C5 (RU) | $k_a$    | $k_d$    | KD       | $t_{1/2}$ |
|-------------|-----------------------|-----------------------------|----------|----------|----------|-----------|
|             |                       |                             | (1/Ms)   | (1/s)    | (M)      | (分)       |
| 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         |
| 対照薬 1       | 232                   | 250                         | 9.69E+04 | 1.46E-04 | 1.51E-09 | 79        |
| 対照薬 2       | 117                   | 170                         | 2.62E+05 | 2.39E-04 | 9.12E-10 | 48        |

【 0 2 3 0 】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4：37℃でのヒト C5 への抗 C5 モノクローナル抗体の結合動力学のパラメーター

| 抗体          | 捕捉された<br>抗体の量<br>(RU) | 100nM 結合<br>したヒト<br>C5 (RU) | $k_a$    | $k_d$    | $K_D$    | $t_{1/2}$ |
|-------------|-----------------------|-----------------------------|----------|----------|----------|-----------|
|             |                       |                             | (1/Ms)   | (1/s)    | (M)      | (分)       |
| 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         |
| 対照薬 1       | 185                   | 246                         | 1.47E+05 | 5.30E-04 | 3.61E-09 | 22        |
| 対照薬 2       | 119                   | 205                         | 2.85E+05 | 6.57E-04 | 2.30E-10 | 18        |

【0231】

25 及び 37 での抗 C5 抗体へのサル C5 - mm h 結合を表 5 及び 6 に示す。

【0232】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5 : 25℃でのサルC5-mmhへの抗C5モノクローナル抗体の結合動力学的パラメーター

| 抗体          | 捕捉された<br>抗体の量<br>(RU) | 100nM 結合<br>したサル<br>C5-mmh<br>(RU) | $k_a$<br>(1/Ms) | $k_d$<br>(1/s) | $K_D$<br>(M) | $t_{1/2}$<br>(分) |
|-------------|-----------------------|------------------------------------|-----------------|----------------|--------------|------------------|
| 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                |
| 対照薬 1*      | 228                   | 11                                 | N/A             | N/A            | 3.11E-07     | N/A              |

N/A=利用不可 ; \* S S =定常状態解析

【 0 2 3 3 】

10

20

30

40

50

【表 6】

表 6 : 37℃でのサル C5-mmh への抗 C5 モノクローナル抗体の結合動力学的  
パラメーター

| 抗体          | 捕捉された<br>抗体の量<br>(RU) | 100nM 結合<br>したサル<br>C5-mmh | $k_a$    | $k_d$    | KD       | $t_{1/2}$ |
|-------------|-----------------------|----------------------------|----------|----------|----------|-----------|
|             |                       |                            | (1/Ms)   | (1/s)    | (M)      | (分)       |
| 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         |
| 対照薬 1       | 132                   | 4                          | NB       | NB       | NB       | NB        |

【 0 2 3 4 】

25 での抗 C5 抗体へのヒト C5 R885H-mmh 及びヒト C5 R885C-mmh の結合をそれぞれ表 7 及び 8 に示す。

【 0 2 3 5 】

10

20

30

40

50

【表 7】

表 7 : 25℃でのヒトC5 R885H-mmhへの抗C5モノクローナル抗体の  
結合動力学のパラメーター

| 抗体         | 捕捉された<br>抗体の量<br>(RU) | 100nM 結合<br>したヒトC5<br>R885H-mmh<br>(RU) | $k_a$    | $k_d$    | $K_D$    | $t_{1/2}$ |
|------------|-----------------------|---|----------|----------|----------|-----------|
|            |                       |   | (1/Ms)   | (1/s)    | (M)      | (分)       |
| 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        |
| 対照薬 1      | 87                    | 11                                      | NB       | NB       | NB       | NB        |
| 対照薬 2      | 118                   | 249                                     | 1.08E+06 | 6.53E-04 | 6.06E-10 | 18        |

【 0 2 3 6 】

10

20

30

40

50

【表 8】

表 8 : 25℃でのヒト C5 R885C-mmh への抗 C5 モノクローナル抗体の  
結合動学的パラメーター

| 抗体         | 捕捉された<br>抗体の量<br>(RU) | 100nM 結合<br>したヒト C5<br>R885C-mmh<br>(RU) | $k_a$    | $k_d$    | $K_D$    | $t_{1/2}$ |
|------------|-----------------------|--|----------|----------|----------|-----------|
|            |                       |  | (1/Ms)   | (1/s)    | (M)      | (分)       |
| 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        |
| 対照薬 1      | 87                    | 9  | NB       | NB       | NB       | NB        |
| 対照薬 2      | 117                   | 241                                      | 1.17E+06 | 6.19E-04 | 5.30E-10 | 19        |

【 0 2 3 7 】

37 での抗 C5 抗体へのヒト C5 R885H-mmh 及びヒト C5 R885C-mmh の結合をそれぞれ表 9 及び 10 に示す。

【 0 2 3 8 】

10

20

30

40

50

【表 9】

表 9 : 37℃でのヒト C5 R885H-mmh への抗 C5 モノクローナル抗体の  
結合動学的パラメーター

| 抗体         | 捕捉された<br>抗体の量<br>(RU) | 100nM ヒト C5<br>R885H-mmh | $k_a$    | $k_d$    | $K_D$    | $t_{1/2}$ |
|------------|-----------------------|--------------------------|----------|----------|----------|-----------|
|            |                       | 結合した (RU)                | (1/Ms)   | (1/s)    | (M)      | (分)       |
| 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         |
| 対照薬 1      | 41                    | 5                        | NB       | NB       | NB       | NB        |
| 対照薬 2      | 23                    | 47                       | 8.39E+05 | 1.05E-03 | 1.25E-09 | 11        |

【 0 2 3 9 】

10

20

30

40

50

【表 10】

表 10 : 37℃でのヒトC5 R885C-mmhへの抗C5モノクローナル抗体の結合の結合動学的パラメーター

| 抗体         | 捕捉した抗体の量 (RU) | 100nM 結合したヒトC5 R885C-mmh (RU) | $k_a$    | $k_d$    | $K_D$    | $t_{1/2}$ |
|------------|---------------|-------------------------------|----------|----------|----------|-----------|
|            |               |                               | (1/Ms)   | (1/s)    | (M)      | (分)       |
| 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         |
| 対照薬 1      | 41            | 2                             | NB       | NB       | NB       | NB        |
| 対照薬 2      | 23            | 42                            | 7.34E+05 | 1.07E-03 | 1.45E-09 | 11        |

## 【0240】

25 で、本発明の全25の抗C5抗体は、表3に示されるようにヒトC5に73pM～8.4nMの範囲に及ぶ $K_D$ 値で結合した。37 では、本発明の抗C5抗体は、表4に示されるように103pM～18.5nMの範囲に及ぶ $K_D$ 値でヒトC5に結合した。25 では、試験された25の本発明の抗C5抗体のうち25が、表5に示されるように133pM～64nMの範囲に及ぶ $K_D$ 値でサルC5-mmhに結合した。37 では、試験された25の本発明の抗C5抗体のうち25が、表6に示されるように133pM～118nMの範囲に及ぶ $K_D$ 値でサルC5-mmhに結合した。25 で試験された本発明の抗C5抗体のうち16が、表7に示されるように147pM～10.9nMの範囲に及ぶ $K_D$ 値でヒトC5 R885H-mmhに結合した。25 で試験された本発明の16の抗C5抗体のうち16が、表8に示されるように251pM～190nMの範囲に及ぶ $K_D$ 値でヒトC5 R885C-mmhに結合した。37 で試験された本発明の16の抗C5抗体のうち16が、表9に示されるように1.49nM～69.4nMの範囲に及ぶ $K_D$ 値でヒトC5 R885H-mmhに結合した。25 で試験された本発明の16の抗C5抗体のうち16が、表10に示されるように1.74nM～159nMの範囲に及ぶ $K_D$ 値でヒトC5 R885C-mmhに結合した。

## 【0241】



#### 実施例 4：異なる pH で C 5 に結合する抗体

精製された抗 C 5 モノクローナル抗体に結合した組み換えヒト C 5 の解離速度に対する pH の効果を、実時間表面プラズモン共鳴バイオセンサーを使用して Biacore T2000 を使用して決定した。Biacore センサー表面を、最初にアミンカップリングによりモノクローナルマウス抗ヒト Fc 抗体 (GE、番号 BR-1008-39) を用いて誘導体化して、ヒト IgG4 Fc を有する発現された抗 C 5 モノクローナル抗体を捕捉した。全ての Biacore 結合試験は、2 つのランニングバッファ PBS-T、pH 7.4 (0.01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.15 M NaCl、0.05 % 体積 / 体積 Tween-20、pH 7.4 に調整) 及び PBS-T、pH 6.0 (0.01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.15 M NaCl、0.05 % 体積 / 体積 Tween-20、pH 6.0 に調整) を使用して行った。様々な濃度のヒト C 5 (EMD、カタログ番号 204888) 又はサル C 5 mmh (PBS-T 中で調製、100 nM から 11.11 nM までの範囲に及び pH 7.4、3 倍希釈) を、抗 C 5 モノクローナル抗体を捕捉した表面上に 3 分間 50 µL / 分の流速で注入し、そして 2 つのランニングバッファ PBS-T、pH 7.4 及び PBS-T、pH 6.0 中でのそれらの解離を 6 分間モニタリングした。全ての結合動力学実験を 25 °C 及び 37 °C で行った。動力学的解離定数 (k<sub>d</sub>) を、Scrubber 2.0 c 曲線フィッティングソフトウェアを使用して実時間センサーグラムを 1:1 結合モデルにフィッティングすることにより決定した。結合解離半減期 (t<sub>1/2</sub>) を k<sub>d</sub> から：

【数 1】

$$t_{1/2} \text{ (分)} = \frac{\ln(2)}{60 * k_d}$$

として計算した。

【0242】

2 つのランニングバッファ PBS-T、pH 7.4 及び PBS-T、pH 6.0 における 25 °C 及び 37 °C での様々な抗 C 5 モノクローナル抗体へのヒト C 5 結合についての半減期の比を表 11 及び 12 に示す。

【0243】

10

20

30

40

50

## 【表 1 1】

表 1 1 : 2 5℃におけるヒト C 5 についての選択された抗 C 5 抗体の半減期の比

| 捕捉された mAb   | t½ 比          |
|-------------|---------------|
|             | 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             |

I C = 不確定

## 【 0 2 4 4 】

10

20

30

40

50

## 【表 1 2】

表 1 2 : 3 7℃におけるヒト C 5 上の選択された抗 C 5 抗体の半減期の比

| 捕捉された mAb   | t½ 比          |
|-------------|---------------|
|             | 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          |

I C = 不確定

## 【 0 2 4 5】

2 つのランニングバッファー P B S - T、p H 7 . 4 及び P B S - T、p H 6 . 0 での 2 5 及び 3 7 における様々な抗 C 5 モノクローナル抗体へのサル C 5 結合についての半減期の比を表 1 3 及び 1 4 に示す。

## 【 0 2 4 6】

10

20

30

40

50

## 【表 1 3】

表 1 3 : 2 5℃におけるサルC 5 上の選択された抗C 5 抗体の半減期の比

| 捕捉された mAb  | t½ 比          |
|------------|---------------|
|            | 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         |

I C = 不確定

## 【 0 2 4 7】

10

20

30

40

50

## 【表 1 4】

表 1 4：37℃におけるサルC5上の選択された抗C5抗体の半減期の比

| 捕捉された mAb  | t <sub>1/2</sub> 比 |
|------------|--------------------|
|            | 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                |

I C＝不確定

## 【0248】

表11～14に示されるように、選択された抗C5抗体は、 $t_{1/2}$ 比によりわかるようにpH依存性結合を示した。

## 【0249】

実施例5：抗C5抗体間のOctet交差競合

抗C5モノクローナル抗体(mAb)間の結合競合を、実時間無標識バイオレイヤー干渉(bio-layer interferometry)アッセイを使用してOctet RED384バイオセンサー(Pall ForteBio Corp.)で決定した。実験全体を25℃で0.01 M HEPES pH7.4、0.15 M NaCl、0.05%体積/体積Surfactant Tween-20、0.1 mg/mL BSA (Octet HBS-P buffer)中で1000 rpmでプレートを振盪しながら行った。2つの抗体がヒトC5(血漿から精製されたhC5、EMD)上のそれらのそれぞれのエピトープへの結合について互いに競合することができるかどうかを評価するために、チップを3分間抗ヒトC5 mAb(以後mAb1と呼ばれる)の50 µg/mL溶液を含有するウェルに沈めることにより、抗hFc抗体被覆Octetバイオセンサーチップ(Pall ForteBio Corp.、番号18-5060)上に約1.5 nmの抗ヒトC5 mAbを最初に捕捉させた。ついで抗体が捕捉されたバイオセンサーチップを、ブロッキングmAbの200 µg/mL溶液を含有するウェル中に4分間浸けることにより、ブロッキングH4HアイソタイプコントロールmAb(以後ブロッキングmAbと呼ばれる)を飽和させた。続いて予め2時間インキュベートされていた50 nM hC5

及び第二の抗ヒトC5 mAb（以後mAb2と呼ばれる）1  $\mu$ Mの共複合体化（co-complexed）溶液を含有するウェルにバイオセンサーチップを4分間浸けた。バイオセンサーチップを、実験の各工程間にOctet HBS-P緩衝液で洗浄した。実時間結合応答を実験の過程の間モニタリングし、そして各工程の終わりに結合応答を記録した。ヒトC5が予め複合体化された（pre-complexed）mAb2のmAb1に対する結合をバックグラウンド結合に対して補正し、比較し、そして様々な抗C5モノクローナル抗体の競合的／非競合的挙動を決定した。

【0250】

表15は、結合の順序とは独立して、両方向で競合する抗体の関係を明確に規定する。

【0251】

【表15】

表15：選択された抗C5抗体の対間の交差競合

| AHC Octet バイオセンサーを使用して捕捉された第一の mAb (mAb1) | mAb1 と競合することが示された mAb2 抗体          |
|---|------------------------------------|
| 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                                 | 無し                                 |
| H4H12161P                                 | 無し                                 |
| H4H11686N                                 | 無し                                 |

【0252】

実施例6：B細胞バイオアッセイにおけるC5媒介補体依存性細胞傷害の阻害

この実施例は、古典的補体経路において抗CD20抗体を使用してC5の役割を試験するバイオアッセイを記載する。B細胞特異的細胞表面抗原CD20に対する治療的抗CD20抗体は、B細胞のCDCをもたらすことが示されており（Glennie et al., 2007, Mol. Immunol., 44:3823-3837）、そしてCD20を発現する細胞株を使用したCDCアッセイは以前に記載されている（Flieger et al., 2000, Cell. Immunol., 204:55-63）。CD20を発現するヒトB細胞株であるDaudi細胞、補体保存血清又は外来C5変異体ではC5欠乏血清、及び抗CD20抗体（米国特許第8,529,902号からの「2F2」のVH/VLを含む抗体）を、CDCにおけるC5の役割を評価するために使用した。

【0253】

C5 CDC バイオアッセイのために、Dauidi 細胞を 96 ウェルアッセイプレート上に 10,000 細胞/ウェルで 10% FBS、ペニシリン/ストレプトマイシン、L-グルタミン、ビルビン酸ナトリウム及び非必須アミノ酸を含有する RPMI (RPMI 完全培地) 又は 1% BSA、ペニシリン/ストレプトマイシン及び L-グルタミン (RPMI/BSA) を含有する RPMI のいずれか中で播種した。変異した抗 hC5 抗体を試験する全てのアッセイは、C5 含有ヒト血清を用いる非変異抗体の試験とともに、RPMI 完全培地で試験したが、非変異抗体を試験するアッセイはアフリカミドリザル血清を用い、そしてヒト C5 変異体は RPMI/BSA 培地で試験された。ヒト又はサル血清を用いて CDC を測定するために、抗 CD20 抗体を 100 nM から 2 pM に 1:3 希釈し (抗体を含有しない対照サンプルを含む)、そして細胞とともに 10 分間 25 でインキュベートし、続いて 1.66% 血清又は 1.66% の C5 欠乏血清及び 6.6 nM C5 変異体タンパク質を加えた。C5 欠乏血清に加えるべき C5 タンパク質の量は、ヒト血清中の C5 濃度の報告された値 0.37 μM に基づくものであった (Rawal et al 2008, J. Biol. Chem. 283: 7853-7863)。CDC の C5 抗体阻害を試験するために、C5 抗体を 100 nM から 2 pM に 1:3 希釈し (抗体を含有しない対照サンプルを含む)、そして 1.66% 血清又は 1.66% の C5 欠乏血清及び 6.6 nM C5 変異体タンパク質とともに 30 分間インキュベートした。血清とともに抗体を細胞に加える 10 分前に、抗 CD20 抗体を細胞に 1 nM、2 nM、3 nM、3.5 nM、7 nM、10 nM、又は 30 nM で加えた。抗 CD20 抗体とのインキュベートの完了時に、抗体/血清混合物を細胞に加えた。細胞傷害を、37 °C の 3.5 時間のインキュベーションの後、Cytotox-Glo™ 試薬 (Promega、番号 G9292) を加えた後に測定した。Cytotox-Glo™ は、細胞死滅を測定する発光ベースの試薬であり、増加した発光は増加した細胞傷害が増加するにつれて観察される (相対的光単位、RLU で測定される)。対照ウェル中の未処理の細胞を、Cytotox-Glo™ 試薬を加えた直後にジギトニンで処理することによりリンスして、細胞の最大殺傷を決定した。プレートを Cytotox-Glo™ を加えた 15 分後に Victor X 機器 (Perkin Elmer) により発光について読み取った。計算された場合、細胞傷害のパーセンテージを、以下の等式を使用することにより RLU 値を用いて計算した:

【数 2】

$$\% \text{細胞傷害} = 100 \times \frac{(\text{実験の細胞溶解} - \text{バックグラウンド細胞溶解})}{(\text{最大細胞溶解} - \text{バックグラウンド細胞溶解})}$$

【0254】

この等式において、「バックグラウンド細胞溶解」は、いずれの CD20 抗体も用いずの培地及び血清のみで処理された細胞からの発光であり、そして「最大細胞溶解」は、ジギトニンで処理された細胞からの発光である。細胞傷害% 又は RLU として表される結果を、Prism 5 ソフトウェア (Graph Pad) を用いて非線形回帰 (4 パラメーターロジスティクス) を使用して解析し、EC<sub>50</sub> 値及び IC<sub>50</sub> 値を得た。0 ~ 100% 阻害が、阻害剤を用いないアッセイにおいて使用された抗 CD20 抗体の濃度から 0 nM 抗 CD20 抗体までの阻害の範囲であるように抗体の阻害を計算した。

【0255】

結果

合計で 25 の抗ヒト C5 抗体 (16 の非変異及び 9 の変異したもの) を、Dauidi 細胞を使用して抗 CD20 抗体及びヒト血清 (正常 hC5 又は C5 変異体を含む) 又はアフリカミドリザル血清を用いた CDC アッセイにおいて C5 を阻害するそれらの能力について試験した。H4H12166P の相補性決定領域 (CDR) 中の様々な残基をヒスチジンに変異させ、9 つの変異した抗体 H4H12166P2 ~ H4H12166P10 を生成

した。CDR中のヒスチジン変異は、標的抗原に結合のpH依存性を付与し、改善された薬物動態をもたらすことを示されている(Igawa et al., 2010, Nat. Biotechnol., 28:1203-1207)。

【0256】

【表16】

表16: Dauidi細胞において1.66%血清及び抗CD20抗体を用いたCDCの未変異抗hC5抗体阻害

| 血清                                       | ヒト       | ヒト      | アフリカ<br>ミドリザル        | C5 欠乏ヒト<br>及び 6.6nM C5<br>変異体 R885H | C5 欠乏ヒト及び<br>6.6nM C5 変異体<br>R885C |
|--|----------|---------|----------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| 抗 CD20 抗体の<br>EC50 [M] (1.66%<br>血清を用いる) | 1.0E-09  | 1.4E-09 | 2.4E-09              | 1.9E-09                             | 2.7E-09                            |
| 一定抗 CD20 抗体<br>(1.66%血清を<br>用いる)         | 1nM      |         | 3nM                  | 3.5nM                               | 30nM                               |
| 抗体                                       | IC50 [M] |         | IC50 [M]<br>(最大阻害%)* | IC50 [M]                            | IC50 [M] (最大<br>阻害%)*              |
| H4H11683N                                | 未試験      | 1.2E-09 | 4.0E-09              | 1.3E-09                             | 9.0E-10                            |
| H4H11686N                                | 未試験      | 1.5E-09 | 4.4E-09              | 1.1E-09                             | 4.5E-10                            |
| H4H12159P                                | 3.2E-09  | 未試験     | 3.4E-09              | 1.4E-09                             | 1.0E-09                            |
| H4H12161P                                | 2.4E-09  | 未試験     | 2.6E-09              | 1.8E-09                             | 1.0E-09                            |
| H4H12163P                                | 3.4E-09  | 未試験     | 3.7E-09              | 2.1E-09                             | 1.1E-09                            |
| H4H12164P                                | 2.4E-09  | 未試験     | 5.8E-09              | 1.8E-09                             | 8.2E-10                            |
| H4H12166P                                | 2.6E-09  | 未試験     | 4.5E-09              | 1.3E-09                             | 4.6E-10                            |
| H4H12167P                                | 2.5E-09  | 未試験     | 3.5E-09              | 1.9E-09                             | 1.0E-09                            |
| H4H12168P                                | 1.5E-09  | 未試験     | 2.0E-09              | 2.3E-09                             | 8.6E-10                            |
| H4H12169P                                | 1.7E-09  | 未試験     | 2.9E-09              | 1.3E-09                             | 6.7E-10                            |
| H4H12170P                                | 2.0E-09  | 未試験     | 3.7E-09              | 4.8E-10                             | 4.3E-10                            |
| H4H12171P                                | 1.9E-09  | 未試験     | 3.3E-09              | 1.6E-09                             | 6.5E-10                            |
| H4H12175P                                | 2.2E-09  | 未試験     | 5.2E-09              | 4.2E-09                             | >2.0E-08 (67%)                     |
| H4H12176P2                               | 2.7E-09  | 未試験     | 3.5E-09              | 2.1E-09                             | 1.3E-09                            |
| H4H12177P2                               | 2.2E-09  | 未試験     | 6.1E-09              | 2.4E-09                             | 1.6E-09                            |
| H4H12183P2                               | 1.7E-09  | 未試験     | 1.4E-08              | 1.2E-09                             | 4.5E-10                            |
| 対照薬 1                                    | 2.3E-09  | 1.8E-09 | >9.0E-08 (49%)       | 阻害なし                                | 阻害なし                               |
| 対照 mAb 1                                 | 阻害無し     | 阻害無し    | 未試験                  | 未試験                                 | 未試験                                |
| 対照 mAb 2                                 | 未試験      | 未試験     | 阻害無し                 | 阻害無し                                | 阻害無し                               |

\*別の指示がなければ、全ての阻害は約100%である

【0257】

表16及び17に示されるように、全25の抗hC5抗体が、ヒト血清の1.66%で存在するC5により媒介されるCDCの完全阻害を示した。非変異抗体のIC50は1.2~3.4nMの範囲に及んだ。変異抗体のIC50は3.0nM~12nMの範囲に及んだ。親非変異抗体H4H12166Pは、IC50 2.6nM及び2.9nMで完全阻



害を生じた。

【 0 2 5 8 】

【 表 1 7 】

表 1 7 : D a u d i 細胞において 1 . 6 6 % 血清及び抗 C D 2 0 抗体を用いた C D C の  
変異抗 h C 5 抗体阻害

| 血清                                       | ヒト       | アフリカ<br>ミドリザル        | C5 欠乏ヒト及び<br>6.6nM C5 変異体<br>R885H | C5 欠乏ヒト及び 6.6nM<br>C5 変異体 R885C |
|--|----------|----------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| 抗 CD20 抗体の<br>EC50 [M] (1.66%<br>血清を用いる) | 1.9E-09  | 2.6E-09              | 6.3E-09                            | 9.5E-09                         |
| 一定抗 CD20 抗体<br>(1.66%血清を<br>用いる)         | 2nM      | 10nM                 | 7nM                                | 30nM                            |
| 抗体                                       | IC50 [M] | IC50 [M]<br>(最大阻害%)* | IC50 [M]                           | IC50 [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                         |
| 対照薬 1                                    | 2.7E-09  | >1.0E-07 (35%)       | 阻害無し                               | 阻害無し                            |
| 対照 mAb 2                                 | 阻害無し     | 阻害無し                 | 阻害無し                               | 阻害無し                            |

\*別に示されていない場合は、全ての阻害は約 1 0 0 % である。

【 0 2 5 9 】

1 6 の非変異抗 h C 5 抗体は、2 . 0 n M ~ 1 4 n M の範囲に及び I C 5 0 でアフリカミ  
ドリザル C 5 により媒介される C D C の完全阻害を示した。

【 0 2 6 0 】

9 つの変異抗体のうち 4 つは、7 . 1 n M ~ 9 . 9 n M の範囲に及び I C 5 0 でアフリカ  
ミドリザル C 5 により媒介される C D C の完全阻害を示した。残りの 6 つの変異抗体は、  
1 0 n M より大きい I C 5 0 での遮断薬であり、そして最大阻害 ( 1 0 0 n M 抗体 ) は  
3 4 % ~ 8 5 % の範囲に及んだ。親非変異抗体 H 4 H 1 2 1 6 6 P は 4 . 5 n M 及び 5 .  
6 n M の I C 5 0 で完全阻害を生じた。

【 0 2 6 1 】

抗 h C 5 抗体がヒト C 5 変異体、R 8 8 5 H 及び R 8 8 5 C を阻害するかどうかを試験す  
るために、C 5 欠乏ヒト血清を各 C 5 変異体 6 . 6 n M を用いて試験した。全 2 5 の抗 h  
C 5 抗体は、0 . 4 8 n M ~ 4 . 2 n M の範囲に及び非変異抗体の I C 5 0 で C 5 変異体

R 8 8 5 Hにより媒介されるC D Cの完全阻害を示したが、変異抗体のI C 5 0は1 . 3 n M ~ 7 . 0 n Mの範囲に及んだ。親非変異抗体H 4 H 1 2 1 6 6 Pは、1 . 3 n M及び1 . 3 n MのI C 5 0で完全阻害を生じた。

#### 【 0 2 6 2 】

1 6の非変異抗体h C 5 抗体のうち1 5は、0 . 4 3 n M ~ 1 . 6 n Mの範囲に及ぶI C 5 0でC 5 変異体R 8 8 5 Cにより媒介されるC D Cの完全阻害を示した。1つの非変異抗体は、最大阻害6 7 % ( 1 0 0 n M抗体にて ) 及びI C 5 0 > 2 0 n MでC D Cの弱い阻害を示した。全9つの変異抗体は、0 . 7 7 n M ~ 3 . 5 n Mの範囲に及ぶI C 5 0でC 5 変異体R 8 8 5 Cにより媒介されるC D Cの完全阻害を示した。親非変異抗体H 4 H 1 2 1 6 6 Pは0 . 4 6 n M及び0 . 7 6 n MのI C 5 0で完全阻害を生じた。

10

#### 【 0 2 6 3 】

抗C D 2 0抗体は、1 . 6 6 %血清を用いて、ヒト血清について1 . 0 n M、1 . 4 n M、及び1 . 9 n M、アフリカミドリザル血清について2 . 4 n M及び2 . 6 n M、h C 5 変異体R 8 8 5 Hを用いてh C 5 欠乏血清について1 . 9 n M及び6 . 3 n M、そしてh C 5 変異体R 8 8 5 Cを用いてh C 5 欠乏血清について2 . 7 n M及び9 . 5 n MのE C 5 0でD a u d i 細胞のC D Cを示した。関連のないI g G対照抗体、対照m A b 1 及び対照m A b 2のいずれもC D Cのいずれの阻害も示さなかった。

#### 【 0 2 6 4 】

実施例7：ルシフェラーゼアッセイにより決定されたC 5 a 活性の阻害

この実施例は、その受容体の1つであるC 5 a R 1によるC 5 aの活性化を試験するためのアッセイを記載する。C 5 a R 1はGタンパク質共役受容体 ( G P C R ) であり、そして様々なG P C R共役シグナル伝達経路を開始することができる ( M o n k e t a l . , 2 0 0 7、B r . J . P h a r m a c o l . 1 5 2 : 4 2 9 - 4 4 8 )。ヒトC 5 a R 1 ( 受け入れ番号N P \_ 0 0 1 7 2 7 . 1 ) 及びヒトG 1 6 ( 受け入れ番号N P \_ 0 0 2 0 5 9 . 3 ) を用いてリスフェラーゼ受容体 [ N F A T 応答エレメント ( 4 X ) - ルシフェラーゼ ] とともに安定にトランスフェクトされたH E K 2 9 3 細胞を使用してバイオアッセイを確立した。G 1 6は比較的乱雑な ( p r o m i s c u o u s ) Gタンパク質であり、これは様々な種類のG P C Rと共役してP L C - 活性化及びその後のC a + + 上昇をもたらす得、これが今度はN F A T転位及びレポーター遺伝子転写を活性化する ( K o s t e n i s e t a l . , 2 0 0 5、T r e n d s P h a r m a c o l . S c i . 2 6 : 5 9 5 - 6 0 2 )。結果として得られた細胞株H E K 2 9 3 / h G 1 6 / h C 5 a R 1 / N F A T - l u c を単離し、そして1 0 % F B S、N E A A、ペニシリン/ ストレプトマイシン、5 0 0 µ g / m L G 4 1 8、1 0 0 µ g / m L ハイグロマイシンB、及び7 µ g / m L プラストサイジンを含む1 0 % D M E M中で維持した。

20

30

#### 【 0 2 6 5 】

C 5 a ルシフェラーゼバイオアッセイのために、H E K 2 9 3 / h G 1 6 / h C 5 a R 1 / N F A T - l u c 細胞を9 6 ウェルアッセイプレートに2 0 , 0 0 0 細胞/ ウェルで0 . 5 % B S A、ペニシリン/ ストレプトマイシン及びL - グルタミンを追加したO P T I M E M ( I n v i t r o g e n、番号3 1 9 8 5 - 0 7 0 ) 中で播種し、ついで3 7 ° C 及び5 % C O 2 で終夜インキュベートした。血清はh C 5 a を切断し活性化することが示されていたのでB S AをF B Sの代わりに使用した ( K l o s e t a l . , 2 0 1 3、P h a r m a c o l . R e v . 6 5 : 5 0 0 - 5 4 3 )。翌朝に、h C 5 a を1 0 0 n Mから2 p Mに滴定し ( h C 5 a を含有しない対照サンプルを含む )、そして細胞に加えて細胞株についての用量応答滴定曲線を決定した。h C 5 a のh C 5 a 抗体阻害を調べるために、5 0 0 p Mのh C 5 a を細胞に加えた。その直後に、1 0 0 n Mから2 p Mに1 : 3 希釈した抗体を ( 抗体を含有しない対照サンプルを含む ) 細胞に加えた。細胞を5 . 5 時間3 7 ° C で5 % C O 2 の存在下にてインキュベートした。O n e G l o T M 試薬 ( P r o m e g a、番号E 6 0 5 1 ) とともにインキュベートした後にルシフェラーゼ活性を検出した。O n e G l o T Mは、細胞中に存在するルシフェラーゼの量を測定する発光ベースの試薬である。このアッセイにおいて、増加したh C 5 a 活性化は増加したルシフ

40

50

エラーゼ産生及び発光をもたらす（相対的光単位RLUで測定して）。発光の測定をVictor X機器（Perkin Elmer）を使用して行った。Prism 5ソフトウェア（Graph Pad）を用いて非線形回帰（4パラメーターロジスティクス）を使用して結果を解析してEC<sub>50</sub>値及びIC<sub>50</sub>値を得た。0～100%阻害が阻害剤のない500pM hC5aから0nM hC5aまでの阻害範囲であるように抗体の阻害を計算した。

【0266】

HEK293/hG16/hC5aR1/NFAT-luc細胞の500pM hC5a活性化の阻害の程度を測定することにより、その受容体hC5aR1のhC5a活性化を阻害するそれらの能力について4つの抗hC5抗体を試験した。

10

【0267】

【表18】

表18：HEK293/G16/hC5aR1/NFAT-luc細胞における500pM hC5aの抗hC5抗体阻害

| EC <sub>50</sub> [M] hC5a | 3.9E-10              |
|---------------------------|----------------------|
| mAb PID 又は識別番号            | 500pM hC5a の阻害       |
|                           | IC <sub>50</sub> [M] |
| H2aM11682N                | 4.6E-10              |
| H2aM11684N                | 3.5E-11              |
| H2aM11694N                | 1.4E-10              |
| H2aM11695N                | 4.2E-11              |
| 対照 mAb                    | 阻害無し                 |

20

【0268】

表18に示されるように、本発明の4つの抗体は全て、0.035nM～0.46nMの範囲に及ぶIC<sub>50</sub>で500pM hC5aの完全阻害を示した。関連のないIgG対照抗体、対照mAb3は、hC5aのいずれの阻害も示さなかった。hC5aはHEK293/G16/hC5aR1/NFAT-luc細胞をEC<sub>50</sub> 0.39nMで活性化した。

30

【0269】

実施例8：溶血バイオアッセイ

古典的経路溶血アッセイ（CH）及び代替経路溶血アッセイ（AH）を抗体活性を試験するために開発した。

【0270】

CHは古典的補体経路の活性化のためのスクリーニングアッセイであり、これは経路のいずれかの成分の減少、不在、及び/又は不活性に対して感受性である。CHは、ウサギ抗ヒツジ赤血球抗体（溶血素）で予め被覆されたヒツジ赤血球（SRBC）を溶解する古典的経路の血清補体成分の機能的な能力を試験する。抗体で被覆されたSRBCを試験血清とインキュベートした場合、補体の古典的経路は活性化され、そして溶血が生じる。補体成分が存在しない場合、CHレベルはゼロになり；古典的経路の1つ又はそれ以上の成分が減少する場合、CHは減少する。（Nilsson et al 1984、J. Immunol. Meth. 72：49-59）。このアッセイは、高親和性抗ヒトC5抗体の特徴づけ及びスクリーニングのために使用される。

40

【0271】

方法

（A）古典的経路補体溶血アッセイ

50

所望の数のヒツジ赤血球 (SRBC) を GVB++ 緩衝液で洗浄し、そして  $1 \times 10^9$  細胞 / mL で再懸濁させた。SRBC を感作するために、等体積の 1 : 50 希釈されたウサギ抗ヒツジ溶血素 (1.5 mg / mL) と 37 で 20 分間混合した。感作された SRBC 細胞を、溶血アッセイにおいて使用する前に GVB++ 中で  $2 \times 10^8$  細胞 / mL に希釈した。正常ヒト血清又はカニクイザル血清を 2 % 又は 10 % に GVB++ 緩衝液で希釈した。C5 媒介溶血活性の阻害を調べるために、試験抗体を、2 % ~ 10 % 正常ヒト又は 10 % カニクイザル血清若しくはアフリカミドリザル血清中で 0.6 nM ~ 800 nM の範囲に及ぶ濃度で 20 分間 4 でプレインキュベートした。丸底 96 ウェルプレートで溶血活性を測定するために使用した。合計で 100  $\mu$ L の感作されたヒツジ RBC ( $2 \times 10^8$  細胞 / mL) を 96 ウェルプレートにプレティングし、続いて試験抗体とプレインキュベートされたそれぞれの血清サンプル 100  $\mu$ L を加えた。細胞を穏やかに混合し、そして 37 で 60 分間インキュベートした。インキュベーション時間後に、細胞を 4 で 1250 x g で遠心分離により沈降させた。合計 100  $\mu$ L の上清を新しい 96 平底プレートに移し、そして 412 nm で Spectramax マイクロプレートリーダーで読み取った。溶血活性を処理のために 1 ~ 5 % の最終血清濃度で計算した。

【0272】

溶血パーセントを以下のように計算した：

【数3】

$$\text{溶血}\% = 100 \times \frac{(\text{実験細胞溶解} - \text{バックグラウンド細胞溶解})}{(\text{最大細胞溶解} - \text{バックグラウンド細胞溶解})}$$

【0273】

この等式において、「バックグラウンド細胞溶解」は、血清を含有しない GVB++ 緩衝液のみでインキュベートされた細胞からの A412 nm での OD である。「最大細胞溶解」は、水で処理された細胞からの A412 nm での OD である。溶血 % で表される結果を、Prism 5 ソフトウェア (GraphPad) を用いて非線形回帰 (4 パラメーターロジスティクス) を使用して解析し、IC50 値を得た。データは平均  $\pm$  平均の標準誤差として表される。

【0274】

(B) 代替補体アッセイ

所望の数のウサギ赤血球 (RbRBC) を GVB-Mg<sup>2+</sup>/EGTA 緩衝液で洗浄し、そして  $2 \times 10^8$  細胞 / mL で再懸濁させた。正常ヒト又はカニクイザル血清を GVB-Mg<sup>2+</sup>/EGTA 緩衝液中 10 % に希釈した。C5 媒介溶血活性の阻害を試験するために、3 nM ~ 800 nM の範囲に及ぶ濃度の抗体を 20 分間 4 で 5 ~ 10 % 正常ヒト血清又はカニクイザル血清中でプレインキュベートした。丸底 96 ウェルプレートを使用して溶血活性を測定した。合計 100  $\mu$ L の RbRBC ( $2 \times 10^8$  細胞 / mL) を 96 ウェルプレートにプレティングし、続いて抗 C5 抗体とプレインキュベートされた 10 % 正常ヒト血清又はカニクイザル又はアフリカミドリザル血清 100  $\mu$ L を加えた。細胞を穏やかに混合し、そして 37 で 60 分間インキュベートした。インキュベーション時間後に、細胞を 1250 x g で 4 にて遠心分離することにより沈降させた。合計で 100  $\mu$ L の上清を、新しい 96 平底プレートに移し、そして Spectramax マイクロプレートリーダーで 412 nm で読み取った。溶血活性を 5 % 血清の最終血清濃度で計算した。

【0275】

溶血パーセントを以下のように計算した：

【数4】

10

20

30

40

50

$$\text{溶血}\% = 100 \times \frac{(\text{実験細胞溶解} - \text{バックグラウンド細胞溶解})}{(\text{最大細胞溶解} - \text{バックグラウンド細胞溶解})}$$

## 【 0 2 7 6 】

この等式において、「バックグラウンド細胞溶解」は、血清を含有しないか又はいずれの抗 C 5 抗体も用いない G V B - M g / E G T A 緩衝液のみでインキュベートされた細胞からの A 4 1 2 n m の O D である。「最大細胞溶解」は、水で処理された細胞からの A 4 1 2 n m の O D である。抗 C 5 抗体による阻害、I C <sub>50</sub> 値を、P r i s m 6 ソフトウェア ( G r a p h P a d ) を用いて非線形回帰 ( 4 パラメーターロジスティクス ) を使用して計算した。

## 【 0 2 7 7 】

## 結果

## ( A ) ヒト C 5 溶血の阻害

合計 2 5 の抗ヒト C 5 ( h C 5 ) 抗体 ( 1 6 の非変異及び 9 つの変異 ) を、C H 5 0 アッセイにおいて感作されたヒツジ赤血球 ( S R B C ) を使用して、及びウサギ赤血球 ( R R B C ) を使用して A H 5 0 アッセイにおいて正常ヒト血清 ( N H S ) からの C 5 を阻害するそれらの能力について試験した。

## 【 0 2 7 8 】

## 【 表 1 9 】

表 1 9 : 1 % 又は 5 % 正常ヒト血清 ( N H S ) における C P 及び A P 活性の抗 h C 5 抗体阻害

| mAb PID      | ヒト CP                 | ヒト AP                 | ヒト CP  | ヒト AP  |
|--------------|-----------------------|-----------------------|--------|--------|
|              | I C <sub>50</sub> [M] | I C <sub>50</sub> [M] | %最大阻害  | %最大阻害  |
| 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% |
| アイソタイプコントロール | 活性なし                  | 活性なし                  | 活性なし   | 活性なし   |

10

20

30

40

50

## 【 0 2 7 9 】

表 1 9 に示されるように、本発明の 1 6 の抗 h C 5 抗体は、ヒト血清の 1 % で存在する C 5 により媒介される古典的経路 ( C P ) において溶血の 9 4 % より多い阻害を示した。抗体の I C 5 0 は 2 . 1 ~ 5 . 9 n M の範囲に及び、そして阻害パーセントは 9 5 % ~ 9 9 % の範囲に及んだ。全 1 6 の抗 C 5 抗体は、5 % N H S 中に存在する C 5 により媒介される代替経路 ( A P ) 溶血アッセイにおいて 6 0 % より多い阻害 ( H 4 H 1 2 1 6 9 P を除く ) を示した。抗体の I C 5 0 は 1 3 ~ 1 6 0 n M の範囲に及び、そして阻害活性パーセントは 4 4 % ~ 8 1 % の範囲に及んだ。

## 【 0 2 8 0 】

## 【表 2 0 】

10

表 2 0 : 5 % 正常ヒト血清 ( N H S ) における C P 及び A P の抗 h C 5 抗体阻害

| mAb PID          | ヒト CP                | ヒト AP                | ヒト CP | ヒト AP |
|------------------|----------------------|----------------------|-------|-------|
|                  | IC <sub>50</sub> [M] | IC <sub>50</sub> [M] | %最大阻害 | %最大阻害 |
| 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             | 活性なし                 | 74.0% | 活性なし  |
| アイソタイプ<br>コントロール | 活性なし                 | 活性なし                 | 活性なし  | 活性なし  |

20

30

## 【 0 2 8 1 】

表 2 0 に示されるように、9 つの変異した抗 h C 5 抗体は全て、5 % ヒト血清中に存在する C 5 により媒介される C P 及び A P 溶血活性の阻害を示した。C P 溶血アッセイにおいて、親非変異抗体 H 4 H 1 2 1 6 6 P は、1 0 . 9 n M の I C 5 0 で 9 8 % より高い阻害を示した。8 つの変異抗 h C 5 抗体は、1 0 . 3 n M ~ 2 4 . 3 n M の範囲に及び I C 5 0 で 9 0 % より高い阻害を示した。変異体抗 C 5 抗体 1 2 1 6 6 P 1 0 は 7 4 % の部分阻害を示した。A P 溶血アッセイにおいて、親非変異抗体 H 4 H 1 2 1 6 6 P は、2 0 . 9 n M の I C 5 0 で 8 5 % より高い阻害を示した。変異抗 h C 5 抗体は 7 2 ~ 8 3 % の阻害範囲を示し、I C 5 0 抗体は 2 8 n M ~ 0 . 1 5 μ M の範囲に及んだ。

40

## 【 0 2 8 2 】

## ( B ) サル C 5 溶血の阻害

合計 2 5 の抗ヒト C 5 ( h C 5 ) 抗体 ( 1 6 の非変異及び 9 つの変異 ) を、感作ヒツジ赤血球 ( S R B C ) を使用する C H 5 0 アッセイ及びウサギ赤血球 ( R R B C ) を使用する A H 5 0 アッセイにおいてカニクイザル及びアフリカミドリザル由来の C 5 を阻害するそれらの能力について試験した。

## 【 0 2 8 3 】

50

【表 2 1】

表 2 1 : 5 % 正常アフリカミドリザル (AGM) 血清における C P 及び A P 活性の  
抗 h C 5 抗体阻害

|            | AGM 血清<br>CP         | AGM 血清 AP            | AGM CP | AGM AP  |
|------------|----------------------|----------------------|--------|---------|
| mAb PID    | IC <sub>50</sub> [M] | IC <sub>50</sub> [M] | %最大阻害  | %最大阻害   |
| H4H12183P2 | 活性なし                 | 活性なし                 | 活性なし   | 活性なし    |
| 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  | 活性なし                 | 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% |

## 【 0 2 8 4 】

表 2 1 に示されるように、抗 h C 5 抗体は、5 % アフリカミドリザル血清において様々なレベルの C P 又は A P 溶血活性の阻害を示した。C P アッセイにおいて、16 の抗 h C 5 抗体のうち 2 つが溶血活性の阻害を示さなかった。14 の抗体は、25 n M ~ 180 n M の範囲に及ぶ IC<sub>50</sub> で 43 ~ 94 % の範囲に及ぶ阻害を示した。A P 溶血アッセイにおいて、17 の抗体のうち 13 は、22 . 5 n M ~ 233 n M の範囲に及ぶ IC<sub>50</sub> で 17 % ~ 93 % の範囲に及ぶ阻害活性を示した。

## 【 0 2 8 5 】

10

20

30

40

50

【表 2 2】

表 2 2 : 5 % 正常カニクイザル (C y n o) 血清における C P 及び A P 活性の  
抗 h C 5 抗体阻害

|                  | Cyno 血清 CP           | Cyno 血清 AP           | Cyno CP | Cyno AP |
|------------------|----------------------|----------------------|---------|---------|
| mAb PID          | IC <sub>50</sub> [M] | IC <sub>50</sub> [M] | %最大阻害   | %最大阻害   |
| 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%  |
| アイソタイプ<br>コントロール | 活性なし                 | 活性なし                 | 活性なし    | 活性なし    |

## 【 0 2 8 6 】

表 2 2 に示されるように、抗 h C 5 抗体 ( 6 4 % C P 阻害を示した H 4 H 1 2 1 8 3 P 2 を除く ) は、5 % カニクイザル血清において C P 又は A P 溶血アッセイの 9 0 % より高い阻害を示した。C P 溶血アッセイにおいて、抗体の I C 5 0 は 7 . 1 5 n M ~ 1 4 2 n M の範囲に及んだ。A P 溶血アッセイにおいて、抗体の I C 5 0 は 5 . 4 ~ 2 9 . 6 n M の範囲に及んだ。

## 【 0 2 8 7 】

## ( C ) 変異体ヒト C 5 溶血の阻害

選択された抗 C 5 抗体を、C H 5 0 アッセイにおいて C 5 欠乏ヒト血清からの変異体ヒト C 5 ( 本明細書の実施例 3 を参照のこと ) を阻害するそれらの能力について試験した。外来性 C 5 変異体 R 8 8 5 H を追加した C 5 欠乏ヒト血清において、H 4 H 1 2 1 6 6 P 、及び対照薬 2 は、それぞれ 6 . 0 n M 及び 4 . 4 n M の I C 5 0 値、並びにそれぞれ 7 . 6 n M 及び 5 . 5 n M の I C 8 0 値で C P 溶血を遮断した。変異体 R 8 8 5 C について、H 4 H 1 2 1 6 6 P 及び対照薬 2 は、外来性 C 5 変異体を含む C 5 欠乏ヒト血清中の C P 溶血を、それぞれ 9 . 3 n M 及び 6 . 8 n M の I C 5 0 値、並びにそれぞれ 1 1 n M 及び 8 . 2 n M の I C 8 0 値で遮断した。予測されたように、対照薬 1 はヒト C 5 変異体の溶血活性を遮断しなかった。

## 【 0 2 8 8 】



( D ) ヒト C 5 b - 6 複合体の阻害

選択された抗 C 5 抗体を、C H 5 0 アッセイにおいて C 5 欠乏ヒト血清からのヒト C 5 b - 6 複合体を阻害するそれらの能力について試験した。H 4 H 1 2 1 6 6 P は、外来性 h u C 5 b - 6 複合体を追加した C 5 欠乏ヒト血清中で C P 溶血を 3 . 8 n M の I C 5 0 値及び 5 . 8 n M の I C 8 0 値で強く遮断した。対照的に、対照薬 1 は C 5 b - 6 複合体媒介溶血をより低い効力で、それぞれ 5 . 0 n M の I C 5 0 値及び 4 6 n M の I C 8 0 値で遮断した。対照薬 1 は、試験された最も高い濃度で総溶血の 7 0 % が阻害しなかった。対照薬 2 はヒト C 5 b - 6 複合体溶血活性を遮断しなかった。

## 【 0 2 8 9 】

実施例 9 : 抗 C 5 抗体は C P 溶血アッセイにおいて C 5 a の生成を遮断する

10

抗 C 5 抗体が C 5 a の生成を阻害するかどうかを評価するために、古典的経路 ( C P ) 溶血についてのアッセイからの上清を E L I S A により C 5 a レベルについて分析した。

## 【 0 2 9 0 】

C 5 切断の結果として生成された C 5 a は 7 4 アミノ酸のタンパク質フラグメントである。C 5 a は血清カルボキシペプチダーゼにより代謝されて、C 末端アルギニンの除去により、より安定で活性のより低い 7 3 アミノ酸形態、C 5 a d e s - A r g となる。従って C 5 a d e s - A r g の定量は、インビボ及びインビトロでの C 5 a の生成をモニタリングするための信頼できる尺度を提供する。本明細書で使用される M i c r o V u e C 5 a E L I S A キットは、製造者により提供される情報に従って C 5 a d e s - A r g を検出する。予備実験 ( データは示していない ) は、C 5 a の一次 7 4 アミノ酸形態も検出されるということを示す。本実施例の目的のために、両方の形態が集合的に「 C 5 a 」と呼ばれる。

20

## 【 0 2 9 1 】

C 5 a タンパク質レベルを、C P 溶血アッセイからの上清において、実施例 8 に記載されるように H 4 H 1 2 1 6 6 P 又はアイソタイプコントロール抗体とともにプレインキュベートされた補体が保存された正常ヒト血清 ( N H S ) を使用して決定した。C 5 a タンパク質レベルを、M i c r o V u e C 5 a E L I S A キットを使用して製造者の指示に従って測定した。手短には、サンプルを希釈し、そして捕捉抗体 ( ヒト C 5 a 上の新エピトープ ( n e o - e p i t o p e ) に特異的なマウス抗 C 5 a ) で予め被覆されたプレートでインキュベートした。製造者により提供されたヒト C 5 a タンパク質を、校正のための標準として使用した。上清中の C 5 a を、H R P 結合検出抗体 ( C 5 の C 5 a 領域に対するマウスモノクローナル抗体 ) により検出した。発色性 H R P - 基質、3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン ( T M B ) を、H R P 活性を検出するために加えた。1 N 塩酸溶液を使用して反応を停止させ、そして 4 5 0 n m での光学密度 ( O D 4 5 0 ) を S p e c t r a M a x プレートリーダーで測定した。G r a p h P a d P r i s m において非線形回帰 ( 4 パラメーターロジスティクス ) を使用してデータを分析した。C 5 a 濃度は n g / 上清 m L として解析した。

30

## 【 0 2 9 2 】

5 % N H S を使用したアッセイにおいて、H 4 H 1 2 1 6 6 P は C 5 a タンパク質レベルの増加を用量依存性の様式で 8 . 5 n M の I C 5 0 で強く遮断したが、アイソタイプコントロール抗体は C 5 a レベルに対して影響を有していなかった ( 図 1 ) 。最も高い試験された H 4 H 1 2 1 6 6 P 濃度 ( 2 6 7 n M ) での最大遮断は、5 % 血清において最も低い試験された H 4 H 1 2 1 6 6 P 濃度 ( 1 n M ) で観察された 3 4 n g / m L ( 2 . 8 n M ) と比較して、3 . 8 n g / m L ( 0 . 3 n M ) への C 5 a レベルの約 1 0 倍の減少を生じた。最大遮断について観察された C 5 a 濃度は、未処理の 5 % N H S における 2 . 3 n g / m L ( 0 . 2 n M ) のベースライン C 5 a レベルに近かった。

40

## 【 0 2 9 3 】

実施例 1 0 : カニクイザルにおける抗 C 5 抗体の薬物動態及び薬力学の特徴づけ

この実施例は、雄性カニクイザルにおいて実施された選択された抗 C 5 抗体の薬物動態 ( P K ) 及び薬力学 ( P D ) の特徴づけを記載する。内因性 C 5 レベルを、抗 C 5 抗体投薬

50

の前に決定し、そして動物投薬群を階層化するために使用した。

#### 【0294】

カニクイザルにおける総循環C5レベルを、ヒト補体C5 ELISA (Abcam、カタログ番号ab125963)を使用して決定し、これは製造者の推奨に従って行った。サルにおけるC5タンパク質の平均濃度は $0.85 \mu\text{g/mL} \pm 19.17 \mu\text{g/mL}$ と決定された。

#### 【0295】

各抗C5抗体について、4匹のカニクイザルにそれぞれ単回静脈(IV)注射を $15 \text{ mg/kg}$ の用量で投与した。血液サンプルを投薬前から1680時間(70日)まで各動物から集め、処理して血清にし、そして-80でPK及びPDについて分析するまで凍結した。

#### 【0296】

##### ELISAイムノアッセイによる総IgG抗体レベル分析

サル血清サンプル中の総抗体濃度を、未検証直接ELISAを使用して測定した。ELISA手順は、マウス抗ヒトIgG1/IgG4 Fcモノクローナル抗体で被覆されたマイクロタイタープレートを使用した。様々な抗C5抗体をプレートに加え、そしてプレート上に捕捉された抗C5抗体を、ビオチン化マウス抗ヒトIgG4 Fcモノクローナル抗体、続いて西洋ワサビペルオキシダーゼと結合体化されたNeutrAvidin (NeutrAvidin HRP)を使用して検出した。次いでペルオキシダーゼに特異的なルミノールベースの基質を加えて、捕捉された抗C5抗体の合計濃度に比例するシグナル強度を達成した。較正標準及びそれらのそれぞれの名目濃度の相対的光単位(RLU)測定値を、重み付けした4パラメーターロジスティック(4 Parameter Logistic)式を使用してフィッティングし、抗C5抗体の濃度及びアッセイの応答関係を記載した較正式を生成した。定量下限(LLoQ)はこのアッセイ(2%サル血清)において $1.56 \text{ ng/mL}$ であり、そしてそのままのサル血清では $78 \text{ ng/mL}$ であった。

#### 【0297】

##### PKパラメーターの決定

PKパラメーターを、Phoenix(R)WinNonlin(R)ソフトウェア(バージョン6.4、Certara、L.P.)及びIVボラス投薬モデルを使用してノンコンパートメント解析(NCA)により決定した。

#### 【0298】

全てのPKパラメーターは、血清中で観察された最大濃度( $C_{\text{max}}$ )を含むそれぞれの平均濃度値、観察されたピーク濃度の時間、 $t_{\text{max}}$ 、及び観察された推定半減期( $T_{1/2}$ )から誘導された。各抗体について、最後の測定可能な濃度までの濃度対時間曲線下面積( $AUC_{\text{last}}$ )及び時間ゼロから無限大まで推定したもの( $AUC_{\text{inf}}$ )を、線形補間及び均一重み付けを用いて線形台形規則を使用して決定した。

#### 【0299】

##### エクスピボ溶血アッセイによるPD解析

選択された抗C5抗体の薬力学を、エクスピボ古典的経路及び大体経路溶血アッセイを使用して分析した。

#### 【0300】

古典的経路溶血アッセイ: ヒツジ赤血球(SRBC)をGVB++緩衝液( $\text{CaCl}_2$ 及び $\text{MgCl}_2$ を含むゼラチン・ベロナール緩衝液)(Boston BioProducts)で洗浄し、そして $1 \times 10^9$ 細胞/mLで再懸濁させた。SRBCを感作するために、合計 $1 \times 10^9$ /mLのSRBCを等体積の1:50希釈ウサギ抗ヒツジ溶血素( $1.5 \text{ mg/mL}$ )と37で20分間混合した。感作したSRBCを、溶血アッセイにおける使用前に $2 \times 10^8$ 細胞/mLにGVB++緩衝液中で希釈した。カニクイザルからの血液を、PD解析のために投薬前、並びに投薬の5分、4及び8時間、及び1、2、3、5、7、10、14、18、21、28、35、42、49、56、63及び7

10

20

30

40

50

0 日後に集めた。血清を製造してさらなる使用まで凍結させた。アッセイの日に、それぞれの時点からのカニクイザル血清を G V B + + 緩衝液で 1 0 % に希釈した。丸底 9 6 ウェルプレートに溶血活性を測定するために使用した。合計 1 0 0  $\mu$  l の感作 S R B C (  $2 \times 1 0^8$  細胞 / m L ) を 9 6 ウェルプレートに 3 7  $^{\circ}$  でプレーティングし、続いてそれぞれの時点からの 1 0 % カニクイザル血清 1 0 0  $\mu$  l を加えた。S R B C を穏やかに混合し、そして 3 7  $^{\circ}$  で 1 0 分間インキュベートした。インキュベーション時間の後に、細胞を 1 2 5 0  $\times$  g、4  $^{\circ}$  で遠心分離した。合計 1 0 0  $\mu$  L の上清を新しい 9 6 平底プレートに移し、そして S p e c t r a m a x マイクロプレートリーダーにて 4 1 2 n m で読み取った。溶血活性を 5 % の最終血清濃度で計算した。溶血パーセントを、以下の式を使用することにより吸光度値を用いて計算した：

10

【数 5】

$$\text{溶血}\% = 100 \times \frac{(\text{実験細胞溶解} - \text{バックグラウンド細胞溶解})}{(\text{最大細胞溶解} - \text{バックグラウンド細胞溶解})}$$

【0 3 0 1】

この式において、「バックグラウンド細胞溶解」は、血清を含有しない G V B + + 緩衝液のみでインキュベートされた S R B C からの A 4 1 2 n m での O D である。「最大細胞溶解」は、水で処理された S R B C からの A 4 1 2 n m での O D である。溶血 % で表される結果を、P r i s m 5 ソフトウェア ( G r a p h P a d ) を用いて非線形回帰 ( 4 パラメーターロジスティクス ) を使用して解析して I C <sub>50</sub> 値を得た。データは平均  $\pm$  平均の標準誤差として表される。

20

【0 3 0 2】

代替経路溶血アッセイ：所望の数のウサギ赤血球 ( R b R B C ) を G V B - M g <sup>2+</sup> / E G T A 緩衝液で洗浄し、そして  $2 \times 1 0^8$  細胞 / m L で再懸濁させた。カニクイザルからの血液を、P D 解析のために投薬前、並びに投薬の 5 分、4 及び 8 時間、及び 1、2、3、5、7、10、14、18、21、28、35、42、及び 49 日後に集めた。血清を製造してさらなる使用まで凍結させた。丸底 9 6 ウェルプレートに溶血活性を測定するために使用した。合計 1 0 0  $\mu$  l の R b R B C (  $2 \times 1 0^8$  細胞 / m L ) を 9 6 ウェルプレートに 3 7  $^{\circ}$  でプレーティングし、続いて上に列挙されるそれぞれの時点からの 1 0 % カニクイザル血清 1 0 0  $\mu$  l を加えた。R b R B C を穏やかに混合し、そして 3 7  $^{\circ}$  で 6 0 分間インキュベートした。インキュベーション時間の後に、細胞を 1 2 5 0  $\times$  g、4  $^{\circ}$  で遠心分離した。合計 1 0 0  $\mu$  L の上清を新しい 9 6 平底プレートに移し、そして S p e c t r a m a x マイクロプレートリーダーにて 4 1 2 n m で読み取った。溶血活性を、5 % の最終血清濃度について計算し、そして水による R B C の総溶血のパーセンテージとして表した。溶血パーセントを上記のように計算した。

30

【0 3 0 3】

結果

選択された抗 C 5 抗体 ( 表 1 に列挙される ) を、初期実験においてカニクイザル及び C 5 ヒト化マウスにおける延長された薬物動態プロファイルについて試験した ( 実施例 1 0 に記載される )。H 4 H 1 2 1 6 6 P 及び H 4 H 1 2 1 6 1 P を、延長された P K と共役した高親和性を有するとして選択し、そして本明細書以後の実験において対照薬 1 及び対照薬 2 とともに使用した。

40

【0 3 0 4】

カニクイザルに H 4 H 1 2 1 6 6 P、H 4 H 1 2 1 6 1 P、又は対照薬 2 の単回 1 5 m g / k g I V ボーラス用量を投与した。総抗体血清濃度及び古典的経路 ( C P ) 溶血活性パーセントを、7 0 日生存期間の間に 1 9 の時点で決定した。代替経路 ( A P ) 溶血を、5 0 日生存期間の間に 1 7 の時点で決定した。表 2 3 は全 3 つの抗体についての平均抗体濃度を要約する。平均総抗体濃度対時間プロファイルを図 2 に示す。平均 P K パラメータ

50

一を表 2 4 に記載する。

【 0 3 0 5 】

【表 2 3】

表 2 3 : 選択された抗 C 5 抗体の雄性カニクイザルへの単回 1 5 m g / k g 静脈内注射後の血清中の総 I g G の平均濃度

| 時間<br>(投薬後時間) | 数 | Ab の血清濃度 (μg/mL) |             |             |
|---------------|---|------------------|-------------|-------------|
|               |   | 平均±SD            |             |             |
|               |   | H4H12166P        | H4H12161P   | 対照薬 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 |

時間＝単回用量注射後の時間；

SD＝標準偏差；BLQ＝最低定量限界に満たない

【 0 3 0 6 】

I V ボーラス投与後に、H 4 H 1 2 1 6 6 P、H 4 H 1 2 1 6 1 P、及び対照薬 2 の総 I g G 濃度 - 時間プロフィールを、生存期間にわたって初期短期間分布相、続いて単一排出相により特徴づけした。ピーク H 4 H 1 2 1 6 6 P、H 4 H 1 2 1 6 1 P、及び対照薬 2 濃度は非常に似ており、全抗体間の対応する C m a x / 用量値は 1 . 1 倍以内であった（それぞれ 2 9 . 7、3 0 . 4、及び 3 0 . 6 [ ( μ g / m L ) / ( m g / k g ) ] ）（表 2 4 ）。

【 0 3 0 7 】

10

20

30

40

50

【表 2 4】

表 2 4 : 雄性カニクイザルへの選択された抗 C 5 抗体の単回 1 5 m g / k g 静脈内注射後の血清中の総 I g G 濃度の平均薬物動態パラメーター

| パラメーター   | H4H12166P          |         | H4H12161P |         | 対照薬 2  |         |
|--|--------------------|---------|-----------|---------|--------|---------|
|  | 15m g／k g IV (n=4) |         |           |         |        |         |
|  | 平均                 | SD      | 平均        | SD      | 平均     | SD      |
| C <sub>max</sub> (μ g/mL)                      | 445                | 30. 0   | 456       | 26. 2   | 459    | 55. 2   |
| C <sub>max</sub> /用量 (μ g/mL)/(mg/kg)          | 29. 7              | 2. 00   | 30. 4     | 1. 75   | 30. 6  | 3. 68   |
| C <sub>0</sub> (μ g/mL)                        | 448                | 30. 5   | 458       | 26. 6   | 461    | 55. 6   |
| t <sub>max</sub> (時間)                          | 0. 083             | 0       | 0. 083    | 0       | 0. 083 | 0       |
| AUC <sub>last</sub> 日・ (μ g/mL)                | 5080               | 1040    | 2350      | 357     | 2810   | 470     |
| AUC <sub>last</sub> /用量<br>日・ (μ g/mL)/(mg/kg) | 339                | 69. 3   | 157       | 23. 8   | 187    | 31. 3   |
| AUC <sub>inf</sub> 日・ (μ g/mL)                 | 5550               | 671     | 2350      | 356     | 2810   | 470     |
| AUC <sub>inf</sub> /用量<br>日・ (μ g/mL)/(mg/kg)  | 370                | 44. 7   | 157       | 23. 7   | 188    | 31. 4   |
| CL (mL/時/kg)                                   | 0. 114             | 0. 0143 | 0. 270    | 0. 0411 | 0. 228 | 0. 0425 |
| V <sub>ss</sub> (mL/kg)                        | 60. 4              | 4. 85   | 44. 0     | 4. 34   | 45. 3  | 3. 06   |
| t <sub>1/2</sub> (日)                           | 15. 6              | 1. 43   | 5. 50     | 2. 45   | 5. 91  | 1. 13   |

I V = 静脈内 ; n = 動物の数 ;  $C_{max}$  = ピーク濃度 ;  $C_0$  = 外挿により決定された初期濃度 ;  
 $t_{max}$  =  $C_{max}$  までの時間 ; AUC = 濃度 - 時間曲線下面積 ;  $AUC_{last}$  = 時間ゼロから最後の  
 ポジティブ濃度までで計算された AUC ;  $AUC_{inf}$  = 時間ゼロから無限大まで推定された  
 AUC ; CL = 全身クリアランス ;  $V_{ss}$  = 定常状態での分布体積 ;  $t_{1/2}$  = 半減期 ; SD =  
 標準偏差。

注 :  $t_{max}$  は名目時間で表される。

## 【 0 3 0 8 】

濃度 - 時間プロファイルの評価は、研究 7 1 日目まで終末抗体濃度 1 0  $\mu$  g / m L で最も遅い排出を示すことを明らかにした。H 4 H 1 2 1 6 1 P 及び対照薬 2 の薬力学は似ていた ; 両方とも m A b 濃度 1 0  $\mu$  g / m L でそれぞれ 2 2 日及び 2 9 日目まで H 4 H 1 2 1 6 6 P より早い排出を示した。

## 【 0 3 0 9 】

結果として、用量正規化曝露 ( $AUC_{last}$  / 用量) は、H 4 H 1 2 1 6 6 P が 3 3 9 日 \* ( $\mu$  g / m L) / (m g / k g) で最も高い曝露を有していたが、H 4 H 1 2 1 6 1 P 及び対照薬 2 は H 4 H 1 2 1 6 6 P よりも約 2 倍低い曝露、それぞれ 1 5 7 及び 1 8 7 日 \* ( $\mu$  g / m L) / (m g / k g) を有していた。

## 【 0 3 1 0 】

排出相の間の計算された抗体半減期 ( $t_{1/2}$ ) は、投薬群にわたって 5 . 5 ~ 1 5 . 6 日の範囲に及び、そしてまた H 4 H 1 2 1 6 6 P が対応する最も高い  $t_{1/2}$  1 5 . 6 日を有する一方で H 4 H 1 2 1 6 1 P 及び対照薬 2 はそれぞれ 5 . 5 日及び 5 . 9 日の  $t_{1/2}$  値を有していたので、曝露と相関していた。

## 【 0 3 1 1 】

カニクイザル血清サンプルからの抗 C 5 抗体の薬理効果を、感作ヒツジ赤血球 (S R B C) の補体古典的経路 (C P) 溶血及びウサギ赤血球 (R b R B C) の代替経路 (A P) 溶

血によりエキスピボで決定した。溶血活性の阻害を 5 % の最終血清濃度について計算し、そして水による R B C の総溶血のパーセンテージとして表した。表 2 5 は、平均溶血パーセントにより決定された 3 つの抗体のエキスピボ活性を要約する。

【 0 3 1 2 】

【表 2 5】

表 2 5 : 選択された抗 C 5 抗体のエキスピボ古典的及び代替経路溶血パーセント活性

| 時間<br>(投与後の時間) | 数 | カニクイザル血清における古典的経路<br>溶血%, 10 分、平均±SEM |           |               | カニクイザル血清における代替経路溶血%、<br>60 分、平均±SEM |               |               |
|----------------|---|---------------------------------------|-----------|---------------|-------------------------------------|---------------|---------------|
|                |   | H4H12166P                             | H4H12161P | 対照薬 2         | H4H12166P                           | H4H12161P     | 対照薬 2         |
| 0              | 4 | 91.34 ± 7.6                           | 未試験       | 84.36 ± 20.28 | 73.44 ± 17.26                       | 64.90 ± 19.51 | 55.77 ± 10.82 |
| 0.083          | 4 | 3.5 ± 1.4                             | 未試験       | 6.6 ± 6.5     | 5.53 ± 1.98                         | 5.90 ± 3.92   | 3.83 ± 3.93   |
| 4              | 4 | 2.35 ± 1.06                           | 未試験       | 3.16 ± 2.2    | 7.43 ± 2.54                         | 6.53 ± 2.7    | 5.30 ± 2.80   |
| 8              | 4 | 1.55 ± 0.21                           | 未試験       | 1.25 ± 0.21   | 3.53 ± 0.91                         | 4.70 ± 2.77   | 1.98 ± 0.83   |
| 24             | 4 | 7.7 ± 6.08                            | 未試験       | 4.55 ± 2.05   | 13.40 ± 2.77                        | 4.68 ± 1.89   | 4.65 ± 2.35   |
| 48             | 4 | 2.85 ± 2.19                           | 未試験       | 2.6 ± 0.7     | 5.53 ± 2.40                         | 7.68 ± 5.22   | 2.28 ± 0.67   |
| 72             | 4 | 0.9 ± 0.42                            | 未試験       | 1.3 ± 0.28    | 7.95 ± 3.36                         | 5.95 ± 2.23   | 1.45 ± 0.33   |
| 120            | 4 | 1.75 ± 0.07                           | 未試験       | 1.3 ± 0.14    | 16.38 ± 6.91                        | 7.60 ± 1.94   | 1.68 ± 0.22   |
| 168            | 4 | 1.6 ± 1.13                            | 未試験       | 1.4 ± 0.56    | 21.28 ± 8.24                        | 10.75 ± 2.27  | 2.15 ± 0.19   |
| 240            | 4 | 1 ± 0.14                              | 未試験       | 3.7 ± 2.83    | 19.18 ± 10.20                       | 13.53 ± 7.17  | 14.20 ± 16.73 |
| 336            | 4 | 2.55 ± 2.05                           | 未試験       | 37.85 ± 5.3   | 21.10 ± 7.55                        | 50.58 ± 12.91 | 65.60 ± 26.04 |
| 432            | 4 | 1.35 ± 0.91                           | 未試験       | 105.25 ± 3.3  | 15.20 ± 10.86                       | 59.75 ± 12.65 | 54.55 ± 19.11 |
| 504            | 4 | 3.55 ± 2.05                           | 未試験       | 107.1 ± 4.38  | 33.15 ± 8.80                        | 88.55 ± 24.63 | 85.63 ± 27.48 |
| 672            | 4 | 2.2 ± 0.56                            | 未試験       | 88.9 ± 23.05  | 75.25 ± 18.30                       | 88.55 ± 8.53  | 91.58 ± 18.55 |
| 840            | 3 | 3.075 ± 2.70                          | 未試験       | 105.37 ± 53.4 | 46.65 ± 5.30                        | 92.33 ± 5.16  | 91.85 ± 2.33  |
| 1008           | 3 | 15.5 ± 26.6                           | 未試験       | 108.85 ± 2.35 | 58.60 ± 9.48                        | 92.45 ± 6.27  | 92.30 ± 2.69  |
| 1176           | 3 | 58.33 ± 39.55                         | 未試験       | 113.85 ± 2.62 | 72.95 ± 5.87                        | 104.90 ± 3.5  | 101.90 ± 0.42 |
| 1344           | 3 | 71.55 ± 43.02                         | 未試験       | 110.3 ± 1.98  | 未試験                                 | 未試験           | 未試験           |
| 1512           | 3 | 91.375 ± 29.7                         | 未試験       | 110.6 ± 0.85  | 未試験                                 | 未試験           | 未試験           |
| 1680           | 3 | 112.22 ± 4.06                         | 未試験       | 112.15 ± 0.5  | 未試験                                 | 未試験           | 未試験           |

時間＝単回用量注射後の時間数での時間；SEM＝平均の標準誤差；BLQ＝定量下限未満；

NC＝計算していない

【 0 3 1 3 】

表 2 5 及び図 2 に示されるように、PD 効果を、70 日目まで補体 CP (10 分インキュベーション) により測定した。H4H12166P は 35 日まで CP 溶血活性の 95 % より多くを遮断した。活性は 70 日までに試験前の最大溶血レベルに戻った。対照薬 2 は 10 日目まで CP 溶血活性の約 95 % を遮断し、そして活性は 18 日目までに試験前最大溶血レベルまで急速に戻った。

【 0 3 1 4 】

PD 効果も 49 日目まで補体 AP 経路 (60 分インキュベーション) 溶血アッセイにより測定した。表 2 5 及び図 3 に示されるように、H4H12166P は 18 日まで総 AP 溶血活性の 80 % を遮断し、そして活性は 59 日目までに試験前最大溶血レベルに戻った。H4H1216P 及び対照薬 2 は 7 日目まで AP 溶血活性の 90 % を遮断し、そして活性は 21 日目までに試験前最大溶血レベルに戻った。

## 【0315】

実施例11：C5ヒト化マウスにおける抗C5抗体のPK/PDの特徴づけ

この実験セットにおいて、選択された抗C5抗体の薬物動態及び薬力学を、VelociGene (R) 技術 (Valenzuela et al 2003、Nat. Biotechnol. 21: 652 - 659) を使用してヒトC5タンパク質を発現するようにヒト化されたマウスにおいて評価した。ヒト化マウスを、マウスC5遺伝子のエクソン2からエクソン41をヒトC5遺伝子のエクソン2～42と置き換えるように操作した (米国特許出願公開2015/0313194 (本明細書のその全体として加入される) ) に開示される)。

## 【0316】

総循環ヒトC5レベルを、製造者の推奨に従って行われたヒト補体C5 ELISA (Abcam、カタログ番号ab125963) を使用して決定した。

## 【0317】

血清中の総薬物レベルのELISAによる決定

C5結合及び未結合の両方の循環抗C5抗体濃度を、総ヒト抗体分析によりELISAを使用して決定した。手短には、ヤギ抗ヒトIgGポリクローナル抗体をPBS中1 µg/mLで96ウェルプレートに終夜固定化した；プレートを洗浄して未結合のIgGを除去し、ついで5%BSAでブロッキングした。抗C5抗体含有血清サンプルの段階希釈 (6点) 及びそれぞれの抗体の参照標準 (12点) を、抗ヒトIgG被覆プレートに移し、そして1時間インキュベートした。ついでプレートに結合した抗C5抗体を、西洋ワサビペルオキシダーゼと結合したヤギ抗ヒトIgGポリクローナル抗体を使用して検出した。製造者の推薦するプロトコルに従ってプレートをTMB基質で現像し、そして450nmでの光学密度 (OD) のシグナルを、Perkin Elmer Victor X4マルチモードプレートリーダーを使用して記録した。血清中の抗C5抗体濃度を、GraphPad Prismソフトウェアを使用して生成された参照標準校正曲線に基づいて計算した。

## 【0318】

PKパラメーターの決定

PKパラメーターを、Phoenix (R) WinNonlin (R) ソフトウェア (バージョン6.3、Certara、L.P.) 及び血管外投薬モデルを使用してノンコンパートメント解析 (NCA) により決定した。各抗体についてのそれぞれの平均濃度を使用して、観察された推定半減期 ( $t_{1/2}$ ) を含めて全てのPKパラメーター、及び最後の測定可能な濃度までの濃度対時間曲線下の面積 (AUC<sub>last</sub>) を、線形補間及び均一重み付けを使用して決定した。

## 【0319】

溶血アッセイによるPD解析

選択された抗C5抗体の薬力学を、古典的経路補体溶血アッセイを使用して決定した。ヒツジ赤血球 (SRBC) (オルシーバー液中のヒツジ血液) をGVB++緩衝液 (CaCl<sub>2</sub>及びMgCl<sub>2</sub>を含むゼラチンベロナル緩衝液) (Boston BioProducts) で洗浄し、そして $1 \times 10^9$ 細胞/mLで再懸濁させた。感作するために、 $1 \times 10^9$ /mLのSRBCを等体積の1:50希釈されたウサギ抗ヒツジ溶血素 (1.5 mg/mL) と37 °Cで20分間混合した。感作したSRBCを $2 \times 10^8$ 細胞/mLにGVB++中で溶血アッセイの前に希釈した。投与前動物又は投薬後10、20、30、40及び50日目に集められた抗C5抗体を投与されたヒト化C5マウスからの血清サンプルを、GVB++緩衝液で20%に希釈した。感作SRBC合計100 µL ( $2 \times 10^8$ 細胞/mL) を96ウェル丸底プレート中に37 °Cでプレーティングし、続いて160～180 µg/mLヒト補体3 (huC3) タンパク質を追加された20%血清100 µLを加えた。細胞を穏やかに混合し、そして37 °Cで1時間インキュベートした。インキュベーション後に、細胞を1250 x gで4分にて遠心分離した。上清合計100 µLを新しい96平底プレートに移し、そして412 nmでSpectraMaxマ

10

20

30

40

50

マイクロプレートリーダーで読み取った。溶血パーセントを吸光度値を用いて以下の式を使用することにより計算した：

【数 6】

$$\text{溶血}\% = 100 \times \frac{(\text{実験細胞溶解} - \text{バックグラウンド細胞溶解})}{(\text{最大細胞溶解} - \text{バックグラウンド細胞溶解})}$$

【0320】

この式において、「バックグラウンド細胞溶解」は、血清を含有しない GVB++ 緩衝液のみでインキュベートされた SRBC からの A412nm での OD である。「最大細胞溶解」は、水で処理された SRBC からの A412nm での OD である。溶血%で表される結果を、Prism 6 ソフトウェア (Graph Pad) を用いて非線形回帰 (4 パラメーターロジスティクス) を使用して解析して IC50 値を得た。データは平均 ± 平均の標準誤差として表される。

10

【0321】

#### 実験 1

この実験において、例となる抗体 H4H12166P の薬物動態及び薬力学を、ヒト化 C5 マウスにおける対照薬 1 及び対照薬 2 と比較して評価した。総循環ヒト C5 レベルを、製造者の推奨に従って行われたヒト補体 C5 ELISA (Abcam、カタログ番号 ab125963) を使用して決定した。マウスにおけるヒト C5 の平均濃度を  $39.73 \mu\text{g/mL} \pm 17.82 \mu\text{g/mL}$  と決定した。雄性 ( $55.4 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$ 、 $n = 47$ ) マウスと雌性 ( $24.7 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$ 、 $n = 49$ ) マウスとの間に差異があった。

20

【0322】

抗体投薬前に、雄性及び雌性ヒト化 C5 マウスを、平均  $40 \mu\text{g/mL}$  のヒト C5 レベルに従って階層化した。各抗 C5 抗体について、22 匹のマウスのコホートに単回  $15 \text{mg/kg}$  用量の H4H12166P、対照薬 1 又は対照薬 2 を皮下 (s.c.) 注射により投与した。全てのマウスは PK 分析のために投薬前及び注射後 1 日に失血した。さらに、注射の 10、20、30、40 及び 50 日後に、各コホートからの 4 又は 5 匹のマウスのグループを安楽死させ、そして終末血を PK 及び PD 分析のために集めた。1 日目の血清サンプルは、22 匹のマウスのコホート全体の平均であった。血液を処理して血清にし、そして -80 で分析されるまで凍結した。

30

【0323】

生存期間の 50 日にわたって、総抗体濃度を 7 つの時点で決定し、そして溶血活性パーセントを 6 つの時点で決定した。総抗 C5 抗体濃度を表 26 にまとめる。平均総抗体濃度対時間プロフィールを図 4 に示す。平均 PK パラメーターを表 27 に記載する。

【0324】

40



## 【表 2 6】

表 2 6 : ヒト化 C 5 マウスにおける抗 C 5 抗体の単回 1 5 m g / k g 皮下注射後の血清中の総 I g G の平均濃度

| 時間 (日) | 数  | Ab 血清濃度 (μg/mL) |           |           |
|--------|----|-----------------|-----------|-----------|
|        |    | 平均±SD           |           |           |
|        |    | H4H12166P       | 対照薬 1     | 対照薬 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   |

時間＝単回用量注射後の時間 (時間) ; 日＝試験日数 ; SD＝標準偏差 ; SEM＝平均の標準誤差 ; ND＝不検出 ; NS＝サンプルなし。\*対照薬 2 について、50 日目、n＝3 技術的問題に起因して 1 つのサンプルを分析できなかったため。

## 【 0 3 2 5】

## 【表 2 7】

表 2 7 : PK パラメーター

| パラメーター              | 単位      | H4H12166P | 対照薬 1 | 対照薬 2 |
|---------------------|---------|-----------|-------|-------|
| 1 日目 mAb 濃度         | μg/mL   | 178       | 229   | 164   |
| AUC <sub>last</sub> | 日・μg/mL | 2801      | 2708  | 1418  |
| t <sub>1/2</sub>    | 日       | 11.3      | 4.7   | 7.6   |

C<sub>max</sub>＝ピーク濃度 ; AUC＝濃度－時間曲線下面積 ; AUC<sub>last</sub>＝時間ゼロから最後のポジティブな濃度の時点までで計算された AUC ; T<sub>1/2</sub>＝観察された推定半減期

## 【 0 3 2 6】

1 日目の平均濃度対時間プロフィールは、3 つの抗体、H 4 H 1 2 1 6 6 P、対照薬 1 及び対照薬 2 がそれぞれ 1 7 8、2 2 9 及び 1 6 4 μg / mL の同様の血清濃度を有していたことを示す。対照薬 1 は、30 日目まで H 4 H 1 2 1 6 6 P と同様の排出プロフィールを有していたが、40 日目及び 50 日目に、H 4 H 1 2 1 6 6 P に対してクリアランスの急速な増加を示した。50 日目に、H 4 H 1 2 1 6 6 P は約 9 μg / mL の平均抗体血清濃度を有していたが、対照薬 1 及び対照薬 2 は両方とも、0.3 μg / mL という 30 倍低い平均抗体血清濃度を有していた。対照薬 2 は試験された 3 つの抗体のうち最も低い曝露を有し、H 4 H 1 2 1 6 6 P ( 2 8 0 1 日 μg / mL ) 及び対照薬 1 ( 2 7 0 8 日 μg / mL ) と比較して約 2 倍低い AUC<sub>last</sub> ( 1 4 0 8 日 μg / mL ) であった。

## 【 0 3 2 7】

ヒト C 3 を追加したヒト化 C 5 マウス血清サンプルからの抗 C 5 抗体 H 4 H 1 2 1 6 6 P、対照薬 1 及び対照薬 2 の薬理効果を 50 日目まで測定し、そして感作 S R B C の補体古典的経路 ( C P ) 溶血によりエキスピボで決定した。各抗 C 5 抗体についての平均溶血パーセントを表 2 8 にまとめ、そして平均溶血パーセント対時間プロフィールを図 5 に示す。

## 【 0 3 2 8】

【表 2 8】

表 2 8：抗ヒト C 5 抗体のエキスピボ古典的経路溶血活性パーセント

| 時間（日） | 数  | 10%マウス血清における古典的経路溶血%、60 分、平均±SEM |             |             |
|-------|----|----------------------------------|-------------|-------------|
|       |    | H4H12166P                        | 対照薬 1       | 対照薬 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 |

時間＝単回用量注射後の時間（時間）；日＝試験日数；SEM＝平均の標準誤差；ND＝不検出；NS＝サンプル無し。＊対照薬 2 について、50 日、n＝3、技術的問題のため 1 つのサンプルを分析する事ができなかったため。

## 【0329】

H4H12166P、対照薬 1 及び対照薬 2 は、終末補体溶血活性を阻害し、これは抗体曝露と相関しているようであった。H4H12166P は 30 日目まで溶血活性を 85% より多く遮断し、活性は 50 日目までに投薬前ベースラインレベルまで戻った。対照薬 1 及び対照薬 2 はそれぞれ 20 日目及び 10 日目まで約 80% 溶血活性を遮断し、活性は両方について 30 日目までにベースラインに戻った。

## 【0330】

## 実験 2

この実験において、抗 C 5 抗体 H4H12166P、H4H12161P、対照薬 1、及びアイソタイプコントロールの薬物動態及び薬力学を、ヒト化 C 5 マウス（ヒト C 5 発現についてホモ接合性のマウス）において評価した。総循環 C 5 レベルを、製造者の推奨に従って行われたヒト補体 C 5 ELISA（Abcam、カタログ番号 ab125963）を使用して決定した。マウスにおけるヒト C 5 の平均濃度は、 $48.98 \mu\text{g/mL} \pm 15.1 \mu\text{g/mL}$  と決定された。

## 【0331】

抗体投薬の前に、ヒト化雄性及び雌性 C 5 マウスを、ヒト C 5 レベルに従って階層化し、これは平均  $50 \mu\text{g/mL}$  であった。各抗 C 5 mAb について 5 匹のマウスのコホートに、H4H12166P、H4H12161P、対照薬 1 又はアイソタイプコントロールの単回  $15 \text{ mg/kg}$  皮下（s.c.）注射を投与した。全てのマウスは、PK 分析のために、投薬前、注射の 6 時間、1、2、3、4、7、10、13、21、30 及び 45 日後に出血した。さらに、59 日目に、各コホートからの全てのマウスを安楽死させ、そして終末血を PK 及び PD 分析のために集めた。血液を処理して血清とし、分析されるまで  $-80^\circ\text{C}$  で凍結した。

## 【0332】

59 日の生存期間の間に総抗体濃度を 12 の時点で決定し、そして溶血活性パーセントを 1 つの時点で決定した。各抗 C 5 抗体についての総血清抗体濃度を表 2 9 にまとめる。平均総抗体濃度対時間プロフィールを図 6 に示す。平均 PK パラメーターを表 3 0 に記載する。

## 【0333】

10

20

30

40

50

【表 2 9】

表 2 9 : ヒト化 C 5 マウスにおける選択された抗 C 5 抗体の単回 1 5 m g / k g 皮下注射後の血清中の総 I g G の平均濃度

| 時間 (日) | Ab の血清濃度 (μg/mL) 平均±SD |            |            |              |
|--------|------------------------|------------|------------|--------------|
|        | H4H12166P              | H4H12161P  | 対照薬 1      | アイソタイプコントロール |
| 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      |

時間＝単回用量注射後の時間 (時) ; 日＝試験日数 ; SD＝標準偏差 ; SEM＝平均の標準誤差 ; ND＝不検出 ; NS＝サンプルなし。

【 0 3 3 4】

【表 3 0】

表 3 0 : PKパラメーター

| パラメーター       | 単位       | 試験抗体 (平均 ±SD) |            |            |              |
|--------------|----------|---------------|------------|------------|--------------|
|              |          | H4H12166P     | H4H12161P  | 対照薬 1      | アイソタイプコントロール |
| $C_{max}$    | 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      |

$C_{max}$ ＝ピーク濃度 ;  $AUC$ ＝濃度－時間曲線下面積 ;  $AUC_{last}$ ＝時間ゼロから最後のポジティブな濃度の時間までで計算された  $AUC$  ;  $T_{1/2}$ ＝観察された推定半減期。

【 0 3 3 5】

平均濃度対時間プロフィールは、H 4 H 1 2 1 6 6 P、H 4 H 1 2 1 6 1 P、対照薬 1 及びアイソタイプコントロールが、それぞれ 1 . 3 倍以内の同様の  $C_{max}$  値 ( 1 7 8、2 2 5、1 8 3 及び 2 2 1 ) μ g / m L で 1 ~ 3 日目に最大血清濃度 (  $C_{max}$  ) に達したことを示す。H 4 H 1 2 1 6 6 P 及びアイソタイプコントロールは類似した排出プロフィールを有し、残留薬物レベルは 5 9 日目に約 4 μ g / m L であった。H 4 H 1 2 1 6 1 P は H 4 H 1 2 1 6 6 P 及びアイソタイプコントロールよりも速いクリアランスを示したが、対照薬 1 よりもゆっくりと除去された。5 9 日目に、H 4 H 1 2 1 6 1 P は平均血清薬物レベル 0 . 6 μ g / m L を有していたが、対照薬 1 は 0 . 0 8 μ g / m L というほぼ検

出不可能な薬物レベルであった。

【0336】

アイソタイプコントロール、H4H12166P及びH4H12161Pは、1.3倍以内の同様の曝露(AUClast)値(それぞれ4080、3490及び3040日 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を示したが、対照薬1は、H4H12166Pと比較して1.6倍低い曝露(2240日 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を示した。

【0337】

実施例12: 総ヒトC5の濃度を決定するためのLC-MRM-MSベースのアッセイ  
この実施例において、総ヒトC5の血清濃度を、抗C5抗体H4H12166Pの薬物動態/薬力学試験において多重反応モニタリング質量分析と連結された液体クロマトグラフィー(LC-MRM-MS)法を使用して決定した。

10

【0338】

総ヒトC5の血清濃度を、C5の代理としてC5配列に含有される10アミノ酸ペプチドLQGTLPEAR(配列番号359のアミノ酸(aa)1129~1138)の濃度を測定することにより決定した。理論的には、この方法はC5分裂産物C5bも検出し得る。しかし、遊離C5bの不安定性のために、血清中のC5bの濃度は一般的に低く、C5bの大部分はMAC複合体の形態で細胞表面に結合している(Cooper & Muller-Eberhard 1970, J. Exp. Med. 132: 775-93; Hadders et al 2012, Cell Rep. 1: 200-7)。従って、ここで分析される処理された血清サンプルは、もしあれば無視できる量のC5b生成物だけ含有する可能性がある。

20

【0339】

方法

PK/PD研究のために、マウスにH4H12166Pの単回15mg/kg用量を皮下(s.c.)注射により投与した。全てのマウスは、PK分析のために投薬前及び注射後1日目に出血した。さらに、注射の10、20、30、40、50及び60日後に、マウスを安楽死させて、PK及びPD分析のために終末血を集めた。

【0340】

ヒトC5を較正のための参照標準として使用し;そしてC末端安定同位体標識アルギニン残基を有する製造されたヒトC5ペプチドを内部標準として使用した(LQGTLPEAR-13C615N4)。マウスC5遺伝子が削除されている(C5-/-)社内で生成されたC5ノックアウトマウスからの血清において参照標準を3.9~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1:2段階希釈)の範囲に及ぶ濃度で使用した。C5-/-マウスからの血清をネガティブコントロール(ブランク)としても使用した。較正標準、ブランク、及び試験血清サンプル(それぞれ10 $\mu\text{L}$ )を乾燥させ、ついで8M尿素/20mM Tris(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)緩衝液100 $\mu\text{L}$ 中37℃で1時間変性させた。次に、25nM内部標準10 $\mu\text{L}$ を全てのサンプルに加えた。サンプルを、2-ヨードアセトアミド10mMで室温にて30分間アルキル化し、そして50mM炭酸水素アンモニウムを使用して最終体積500 $\mu\text{L}$ に希釈した。ついでサンプルをトリプシン(1:20質量/質量)により終夜37℃で消化した。C5由来のトリプシンペプチドLQGTLPEARを検出し、そしてWaters Xevo TQ-SをACQUITY UPLCシステムとともに使用するLC-MRM-MSにより定量した。処理された各サンプル(10 $\mu\text{L}$ )を予め平衡化されたACQUITY UPLC BEH C18カラムに注入した。流量は0.6mL/分であった(移動相A: 水:ギ酸/100:0.1[体積:体積]及び移動相B: アセトニトリル:ギ酸/100:0.1[体積:体積])。保持時間及びピーク面積をMasslynx Analystデータソフトウェア(Waters)を使用して決定した。内部標準(安定同位体標識C5ペプチド)に対するC5参照標準(hC5のトリプシン消化により生成された未標識C5ペプチドLQGTLPEAR-12C614N4)のピーク面積比を、C5参照標準の名目濃度に対してプロットすることにより構築された較正曲線からC5検体の濃度を計算した。濃度を線形回帰を使用し

30

40

50

て計算した。C5 参照標準の最も低い濃度 ( $3.9 \mu\text{g/mL}$ ) はアッセイのダイナミックレンジ内であり、そしてアッセイの LLOQ と定義された。

【0341】

#### 結果

血清中の総ヒト C5 濃度を、投薬する前に尾出血を介して（投薬前）及び 10、30 及び 35 日目に終末血を介して、対応する動物から集めたサンプルについて評価した。投薬の 10、30、及び 35 日後に H4H12166P 投薬後の総 hC5 濃度は、投薬前レベルと類似していた（約 1 ~ 0.9 倍以内）。観察された少量の差異は、GraphPad Prism ソフトウェアを使用した Mann-Whitney 検定により評価して統計的に有意ではなかった。C5 / H4H12166P モル比の分析は、H4H12166P が投薬後 35 日目まで C5 のモル過剰のままであるということを実証した（表 31）。

【0342】

【表 31】

表 31 : H4H12166P の PD 特徴の要約

| 投薬後<br>日数 | CP 溶血%<br>平均±SD                  | 阻害% | C5 (μg/mL) |      |      | H4H12166P<br>(μg/mL)<br>平均±SD | モル比 終末<br>C5 : H4H12166P |
|-----------|----------------------------------|-----|------------|------|------|-------------------------------|--------------------------|
|           |                                  |     | 投薬前        | 終末   | 倍数変化 |                               |                          |
| 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        | 群内の全ての動物は MAHA 力価>1000 のために除外された |     |            |      |      |                               |                          |
| 60        | 73.57                            | 5   | n/d        |      |      | 5.9                           | n/d                      |

<sup>a</sup> CP 溶血活性の阻害パーセンテージを、0 日目の平均 CP 溶血%値と比較して示された投薬後の日における平均 CP 溶血%から計算した。<sup>b</sup> 倍数変化 = 終末（示された投薬後の日）C5 : 投薬前 C5。SD = 標準偏差；MAHA = マウス抗ヒト抗体；n/d = 未決定。MAHA に影響を受けたデータを有する動物を計算から完全に排除した（2 x 30 日目、1 x 35 日目、2 x 40 日目、及び 50 日目の全 4 匹のマウス）

【0343】

実施例 13 : 水素 / 重水素交換による C5 への H4H12166P 結合のエピトープマッピング

H4H12166P が相互作用する hC5 [（配列番号 359 のアミノ酸 M1 - C1676）のアミノ酸残基を決定するために、質量分析を用いた H/D 交換エピトープマッピングを行った。H/D 交換法の一般的な説明は、例えば、Ehring（1999）Analytical Biochemistry 267（2）: 252 - 259；及び Engen and Smith（2001）Anal. Chem. 73: 256A - 265A に示される。

【0344】

重水素標識のための Leaptec HDX PAL システム、サンプル消化及びローディングのための Waters Acquity M - クラス（補助溶媒マネージャー）、分析カラムグラジエントのための Waters Acquity M - クラス（ $\mu$ Binary 溶媒マネージャー）、並びに消化ペプチド質量測定のための Synapt G2 - Si 質量分光計からなる一体化 HDX / MS プラットフォームで HDX - MS 実験を行

った。

#### 【0345】

標識化溶液をD<sub>2</sub>O中10mM P B S緩衝液でpD 7.0 (pH 6.6に等しい)にて製造した重水素標識のために、C5 3.8 μL (6 pmol / μL)又は1:1モル比で抗体と予め混合されたC5を、56.2 μL D<sub>2</sub>O標識化溶液と様々な時点でインキュベートした(例えば、非重水素化コントロール=0秒、1分間及び20分間標識)。重水素化をサンプル50 μLを、予め冷却したクエンチ緩衝液50 μL (0.2 M TCEP、100 mMリン酸緩衝液中6 M塩化グアニジン、pH 2.5)を移すことによりクエンチし、そして混合したサンプルを1.0 で2分間インキュベートした。次いで、クエンチしたサンプルをWaters HDXマネージャーにオンラインペプシン/プロテアーゼXIII消化のために注入した。消化されたペプチドをACQUITY UPLC BEH C18 1.7-μm、2.1 x 5 mm VanGuardプレカラム上に0 で捕捉し、そして分析カラムACQUITY UPLC BEH C18 1.7-μm、1.0 x 50 mmに5%~40% B (移動相A:水中0.1%ギ酸、移動相B:アセトニトリル中0.1%ギ酸)へ9分間グラジエント分離のために溶出した。質量分析計を、コーン電圧37 V、スキャン時間0.5秒、及び質量/電荷範囲50~1700 Thomson単位(Th)に設定した。

10

#### 【0346】

ヒトC5からのペプチドの同定のために、非重水素化サンプルからのLC-MS Eデータを処理し、そしてヒトC5、ペプシン、及びそれらの無作為化配列を含むデータベースに対してWaters ProteinLynxグローバルサーバー(PLGS)ソフトウェアを介して検索した同定されたペプチドをDynamXソフトウェアにインポートし、そして2つの基準でフィルタリングした:(1)=アミノ酸あたりの最小生成物=0.3及び(2)反復ファイル閾値=3。次いでDynamXソフトウェアは、各時点に3つの複製を有する多数の時点にわたって保持時間及び高質量精度(<10 ppm)に基づいて各ペプチドの重水素取り込みを自動的に決定した。

20

#### 【0347】

MS Eデータ取得と連結されたオンラインペプシン/プロテアーゼXIIIカラムを使用して、ヒトC5からの合計189のペプチドを抗体の存在しない場合又は存在下で同定し、62%配列範囲を表した。5つのペプチドは、H4H12166Pに結合した場合に有意に減少した重水素取り込みを有しており(重心(Centroid)デルタ値>0.9ダルトン、p値<0.05)、これは表32に示される。

30

#### 【0348】

#### 【表32】

表32: H4H12166Pへの結合の際のヒトC5ペプチドの重水素化

| 残基      | 1分重水素化                  |                                    |       | 20分重水素化                  |                                    |       |
|---------|-------------------------|------------------------------------|-------|--------------------------|------------------------------------|-------|
|         | C5<br>重心 H <sup>+</sup> | C5+H4H12166P<br>重心 MH <sup>+</sup> | Δ     | C5<br>重心 MH <sup>+</sup> | C5+H4H12166P<br>重心 MH <sup>+</sup> | 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 |

40

#### 【0349】

記録されたペプチド質量は、3つの複製からの重心MH<sup>+</sup>質量の平均値に対応する。アミノ酸591~599及び775~794に対応するこれらのペプチドは、H4H1216

50

6 P に結合するとより遅い重水素化速度を有していた。これらの同定された残基は、UniProt エントリー P01031 (CO5\_HUMAN; 配列番号 359) により定義されるヒト C5 の残基 591 ~ 599 及び 775 ~ 794 にも対応する。

#### 【0350】

実施例 14：マウスにおける実験的自己免疫ぶどう膜炎における眼炎症に対する抗 C5 抗体の効果

本試験は、実験的自己免疫ぶどう膜炎 (EAU) における C5 の役割を評価するために始められた。遺伝的 [C5 ノックアウト (KO)、C3 / C5 二重 KO マウス]、及び薬理的 (抗 C5 抗体) の両方の実験アプローチを使用した。

#### 【0351】

##### 方法

成体 C57BL / 6J マウス (n = 25、Jackson Labs)、C5 KO (n = 13) 及び C3 / C5 KO (n = 8) マウス (Regeneron Pharmaceuticals Inc.) を使用した。完全フロイントアジュバントでのヒト光受容体間レチノイド結合タンパク質ペプチド (IRBP、New England Peptide) の皮下注射及び百日咳毒素の腹腔内注射により EAU を誘導した。抗マウス C5 mAb 又はアイソタイプコントロール mAb を、5 日目から 28 日目まで 3 日ごとに皮下注射により投与した。この試験において使用した抗 C5 抗体 (M1M17628N) は配列番号 362 / 363 の HCVR / LCVR を含んでいた。SPECTRALIS (R) HRA + OCT (Heidelberg Engineering、Inc.) を使用して、-1、7、14、21 及び 28 日目の炎症レベルを評価した。全ての動物を 28 日目に眼及び血液収集のために安楽死させた。ヒト C3 を用いるか又は用いない溶血アッセイを、補体阻害を実証するために行った。データを ANOVA により分析した。

#### 【0352】

##### 結果

野生型マウスと比較して、炎症発生 (30 ~ 50%) 及び硝子体細胞クラスター数は C5 KO マウスにおいて有意に減少した ( $p < 0.01$ )。C5 KO マウスにおける光干渉断層撮影 (OCT) スコアもまた 3 週目に 50% 有意に減少した ( $p < 0.0001$ )。興味深いことに、C3 / C5 二重 KO マウスにおいて、野生型マウスと比較して、28 日目に有意により多くの硝子体細胞クラスター及びより高い疾患スコアがあった ( $p < 0.05$ )。抗 mC5 Ab (50 mg / kg) を投与された動物において、炎症発生率及び硝子体細胞クラスターは、21 日目に未処置又はアイソタイプコントロール群のいずれかと比較して有意に低かった ( $p < 0.01$ )。3 週及び 4 週目に、抗 C5 抗体処置群における OCT スコアは、未処置又はアイソタイプコントロールと比較して有意に低かった ( $p < 0.0001$ )。(図 7) ヒト C3 を用いるか又は用いない溶血アッセイにより、4 週目に抗 C5 抗体の阻害効果を確認した (図 8)。

#### 【0353】

##### 結論

EAU に起因する眼の炎症は、遺伝的欠損又は特異的抗 C5 抗体を用いた薬理的阻害のいずれかにより C5 活性を阻害することにより軽減された。C5 欠乏は EAU の発生を遅らせ、そして OCT 疾患スコアを減少させた。これらの結果は、C5 が自己免疫ぶどう膜炎についての可能性のある治療標的であることを示す。抗 C5 抗体は、野生型マウスにおいて EAU 疾患に対する保護効果を有する。我々の知見もまた、C3 がマウスにおける EAU 疾患に有益であり得ることを示唆する。

#### 【0354】

実施例 15：実験的自己免疫ぶどう膜炎に対する抗ヒト C5 抗体の効果

この実施例は、実験的自己免疫ぶどう膜炎 (EAU) のマウスモデルにおいてヒト C5 に対する抗 C5 抗体の効果を記載する。この試験に使用されたマウスは、Velocigen (R) 技術 (Valenzuela et al 2003、Nat. Biotechnol. 21: 652 - 659) を使用してヒト C5 タンパク質を発現するようにヒト化

10

20

30

40

50

された。ヒト化マウスを、マウス C 5 遺伝子のエクソン 2 ~ エクソン 4 1 をヒト C 5 遺伝子のエクソン 2 ~ 4 2 で置き換えるように操作した ( 米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 3 1 3 1 9 4 号 ( その全体として本明細書に加入される ) に開示される ) 。

【 0 3 5 5 】

方法

成体雄性マウスを、マイコバクテリウム・ツベルクローシス ( *Mycobacterium tuberculosis* ) 株 H 3 7 R A を 2 . 5 m g / m l まで追加した C F A の 0 . 2 m l エマルジョンでヒト光受容体間レチノイド結合タンパク質 ( I R B P ) ペプチド 1 ~ 2 0 ( G P T H L F Q P S L V L D M A K V L L D ) ( 配列番号 3 6 4 ) ( *Avichezer et al 2000, Invest . Ophthalmol . Vis . Sci . 41 : 127 - 131* ) 150  $\mu$  g を皮下で免疫した。次いで、免疫応答の T h 1 極性化を促進することにより細胞媒介自己免疫の誘導を容易にするために、百日咳毒素 ( P T X ) 1 . 0  $\mu$  g をマウスに腹腔内接種した ( *Thureau et al 1997, Clin . Exp . Immunol . 109 : 370 - 376 ; Silver et al 1999, Invest . Ophthalmol . Vis . Sci . 40 : 2898 - 2905* ) 。動物の体重を週に 2 回モニタリングした。

【 0 3 5 6 】

眼の試験を - 1 日目、E A U 誘導前、並びに 7、14、21 及び 28 日目に行った。マウスをケタミン ( 120 m g / k g、I P ) 及びキシラジン ( 5 m g / k g、I P ) で麻酔した。トロピカミドの 0 . 5 % 点眼液を使用して瞳孔を散大させ、そして眼底カメラを備えたコンタクトレンズを使用して S p e c t r a l i s H e i d e l b e r g 網膜血管造影プラットフォーム ( H R A ) + O C T システム ( H e i d e l b e r g E n g i n e e r i n g、C a r l s b a d、C A、U S A ) において試験した。

【 0 3 5 7 】

S p e c t r a l i s H R A + O C T システム ( H e i d e l b e r g E n g i n e e r i n g、C a r l s b a d、C A、U S A ) で O C T 機能を使用して各眼について一連の 61 の側方光学断面を得た。O C T 画像化領域を、視神経円板の中心にして視神経乳頭の上下の等しい画像化を可能にした。網膜の厚さを R P E 層の下部から眼の内境界膜まで間の距離として測定した。視神経円板から 1500  $\mu$  m を測定し、そして 4 つの異なる網膜の四分円 ( 例えば、上方、下方、側方及び鼻側 ) からの値を、眼の平均網膜厚のために平均した。

【 0 3 5 8 】

硝子体への炎症性細胞浸潤の重症度も、眼ごとに視神経を横断する 4 つの側方 O C T スキャンにおいて硝子体における炎症細胞クラスターの平均数を評価することにより O C T 画像において等級付した。

【 0 3 5 9 】

O C T 画像における疾患重症度の評価のために 4 点スケールを開発した ( O C T スコア ) ( 表 33 ) 。

【 0 3 6 0 】

10

20

30

40

50



## 【表 3 3】

表 3 3 : 光干渉断層撮影 (OCT) を使用したインビボでのEAUスコアリング

| 等級       | 基準   |    |
|----------|--|----|
| 0        | 変化なし   |    |
| 0.5 (微量) | 主に視神経乳頭近傍の硝子体における微量の炎症細胞浸潤 (<15 クラスター)   |    |
| 1        | 主に視神経乳頭近傍の硝子体における軽度炎症細胞浸潤 (<25 クラスター); 周辺部における軽度の限局的な網膜下病巣 (灰色スポット); 周辺部における軽度の網膜ひだ; 網膜血管拡張; 血管周辺炎及び血管炎  | 10 |
| 2        | より広汎であるが遠周辺部にはない硝子体における中程度の炎症細胞浸潤 (<50 クラスター); 網膜層破壊; 主に周辺部における網膜ひだを伴う小～中サイズの肉芽腫形成; 血管拡張; 微量の限局的脈絡膜新生血管; 血管周辺炎及び血管炎; 微量の網膜浮腫 (<10 $\mu\text{m}$ )                                  |    |
| 3        | 中程度から重度の硝子体におけるびまん性炎症細胞浸潤 (>50 クラスター); びまん性網膜層破壊及び内顆粒層における拡張した血管; 網膜全体の網膜ひだを伴う中～大肉芽腫形成; 重度の網膜血管拡張; 血管周辺炎及び血管炎; 中程度のびまん性脈絡膜新生血管; 中程度から重度の網膜浮腫 (10～40 $\mu\text{m}$ ); 微量の網膜剥離       | 20 |
| 4        | 硝子体における重度びまん性炎症細胞浸潤 (>70 クラスター); びまん性層破壊及び内顆粒層における拡張した血管; 網膜ひだを伴う重度のびまん性肉芽腫形成; 重度のびまん性脈絡膜新生血管; 血管周辺炎及び血管炎; 網膜変性又は重度の網膜浮腫 (それぞれ>20 $\mu\text{m}$ 喪失又は>40 $\mu\text{m}$ 増加); 大きな網膜剥離 | 30 |

## 【0 3 6 1】

## 統計解析

パラメーターデータについての統計解析 (体重、硝子体における炎症細胞クラスター、及び網膜厚) を、片側 ANOVA 検定及び Tukey の多重比較検定により行った。ノンパラメトリックデータについて (OCT スコア及び組織学スコア)、クラスカル - ウォリス検定及びダン検定により Graph Pad Prism バージョン 5.0 d ソフトウェアを用いてアイソタイプコントロール又は未処置群と比較して行った。データは平均値  $\pm$  SEM を示す。0.05 未満の p 値を統計的に有意とみなした。

## 【0 3 6 2】

## 結果

第一の試験において (試験 A)、マウスをアイソタイプコントロール抗体 (50 mg / kg)、又は H4H12170P 10 mg / kg 若しくは 50 mg / kg で 5 日目から 3 日ごとに皮下処置した。10 mg / kg H4H12170P を用いた処置は、炎症及び網膜損傷の減少を生じた (図 9)。10 mg / kg H4H12170P で処置されたマウスはまた、21 日目及び 28 日目に OCT スコアの統計的に有意な減少も示した (図 10)。

## 【0 3 6 3】

10

20

30

40

50

第二の試験において（試験 B）、アイソタイプコントロール（10 mg / kg）、H4H12166P 3 mg / kg 若しくは 10 mg / kg、又は対照薬 2（本明細書の実施例 2；「以下の実施例において使用された対照構築物」を参照のこと）のいずれかを用いて 6 日目から 3 日ごとにマウスを皮下処置した。3 mg / kg 又は 10 mg / kg のいずれかでの H4H12166P を用いた処置は、14 日目から 28 日目に統計的に有意である OCT スコアの用量関連減少を生じた（図 11）。C5 ヒト化マウスにおいてEAU 誘導の 6 日後に開始した 10 mg / kg H4H12166P を用いた処置は、14 日目～28 日目に得られた OCT により決定して炎症及び網膜損傷の用量関連減少を生じた（図 12）。

#### 【0364】

両方の試験について、非侵襲性の OCT による生存中評価は、IRBP を用いた免疫後の対照マウスにおいて進行性の炎症の発生、増加した網膜厚及び形態異常を示した。

#### 【0365】

##### 結論

これらの実験は、C5 が自己免疫ぶどう膜炎の病理において役割を果たすというさらなる薬理的証拠を提供する。完全ヒト抗ヒト C5 抗体の薬理的欠乏は、EAU 発生を遅らせ、そして疾患重症度減少し、自己免疫ぶどう膜炎におけるこれらの抗体の有効性を確立する。

#### 【0366】

実施例 16：腎虚血 - 再灌流傷害に対する抗 C5 抗体の効果

本試験は、腎虚血 - 再灌流傷害における C5 の役割を評価するために行われた。遺伝的（C3 ノックアウト及び C5 ノックアウトマウスを使用する）及び薬理的アプローチ（抗 C5 抗体を使用する）の両方を使用した。虚血 - 再灌流モデルを、45 分間両側腎莖をクランプし、続いて 48 時間の再灌流により誘導した。偽開腹が対照としての役目を果たした。抗 C5 抗体を 50 mg / kg で静脈内に単回用量として虚血直後に（治療的）；又は 2 回用量として、-1 日目及び 1 日目の手術時に皮下投与した（予防的）。この試験に使用した抗 C5 抗体は、配列番号 362 / 363 の HCVR / LCVR を含む M1M17628N であった。血中尿素窒素（BUN）及び血清クレアチニンマーカーを、マウスにおける疾患及び保護のレベルを評価するために使用した。

#### 【0367】

#### 【表 34】

表 34：予防的及び治療的様式で抗 C5 抗体（M1M17628N）で処置されたマウスにおける血中尿素窒素レベルの変化パーセント

| BUN、% 変化 対            | RIRI + Veh | RIRI + アイソタイプコントロール |
|-----------------------|------------|---------------------|
|                       | 2 日目       | 2 日目                |
| RIRI + M1M17628N（予防的） | -37.19     | -34.68              |
| RIRI + M1M17628N（治療的） | - 53.70    | -51.85              |

#### 【0368】

10

20

30

40

50

## 【表 3 5】

表 3 5 : 予防的及び治療の様式で抗 C 5 抗体 (M1M1 7 6 2 8 N) を用いて処置されたマウスにおける血清クレアチニンレベルの変化%

| SCr、% 変化 対.            | RIRI + Veh | RIRI + アイソタイプコントロール |
|------------------------|------------|---------------------|
|                        | 2 日目       | 2 日目                |
| RIRI + M1M17628N (予防的) | -53.09     | -49.34              |
| RIRI + M1M17628N (治療的) | -59.40     | -56.16              |

10

## 【0 3 6 9】

野生型マウスと比較して、C 3 及び C 5 ノックアウトマウスは、血中尿素窒素及び血清クレアチニンレベルの減少により証明されるように、急性腎臓傷害の R I R I モデルにおいて有意な機能的保護を示した。抗 C 5 抗体は、予防的及び治療的の両方の様式で R I R I モデルにおいて機能的保護を示した (表 3 4 ~ 3 5)。

## 【0 3 7 0】

20

実施例 1 7 : ループス腎炎に対する抗 C 5 抗体の効果

この実施例は、マウスモデルにおいてループス腎炎を処置する際の抗 C 5 抗体の有効性を記載する。

## 【0 3 7 1】

全身性エリテマトーデス (S L E) は、自己抗原に対する忍容性の喪失、自己抗体の産生及び損傷組織における補体結合免疫複合体 (I C) の沈着により引き起こされる自己免疫障害である。S L E は広範囲の臨床症状及び標的器官を特徴とし、ループス腎炎は最も深刻な合併症の 1 つである。ループス腎炎患者の腎臓における補体活性化は、炎症及び組織損傷に寄与する。ループス腎炎の処置における抗 C 5 抗体の有効性を、ループス腎炎の自然発症マウスモデルである N Z B W F 1 マウスにおいて調べた (Y a n g e t a l 1 9 9 6、P N A S)。マウスは、ヒト S L E に似た自己免疫疾患、核内抗原に対する自己抗体及び細胞膜タンパク質、高ガンマグロブリン血症、アルブミン尿、タンパク尿を発症し、免疫複合体糸球体腎炎を引き起こし、そして 3 5 ~ 5 0 週齢で腎不全及び終末期腎疾患で死亡する。

30

## 【0 3 7 2】

この試験のために、2 5 週齢 N Z B W F 1 マウスを、3 0 m g / k g のアイソタイプコントロール、又は抗 C 5 抗体で週に 2 回 8 週間、続いて週に 3 回 1 0 週間皮下処置した。この試験のために使用した抗マウス C 5 抗体は、それぞれ配列番号 3 6 2 / 3 6 3 及び 3 6 5 / 3 6 6 の H C V R / L C V R を含む M 1 M 1 7 6 2 8 N 及び M 1 M 1 7 6 2 7 N であった。

40

## 【0 3 7 3】

抗 C 5 抗体での処置はマウスにおいて生存率を有意に改善した (図 1 3)。両方の抗体が、処置の 8 ~ 1 4 週目にアルブミン尿 (図 1 4)、及び処置の 1 2 ~ 1 6 週目に血中尿素窒素 (図 1 5) を改善した。

## 【0 3 7 4】

実施例 1 8 : 星状細胞細胞死に対する抗 C 5 抗体の効果

視神経脊髄炎 (N M O) は、主に視神経及び脊髄に影響を及ぼす中枢神経系 (C N S) の自己免疫疾患である。N M O において、抗アクアポリン 4 自己抗体 (A Q P 4 - A b) は補体依存性細胞傷害 (C D C) を活性化することにより正常細胞への損傷を引き起こす。この試験の目標は、N M O 進行における補体系の役割、及び N M O のための可能性のある

50

治療的処置としての補体に対する抗体の使用を評価することであった。

#### 【0375】

初代ラット皮質星状細胞を生後ラット仔の脳皮質から得て、AQP4 - Ab (米国特許出願公開2014/0170140号からの抗体「rAb-53」; Bennett et al 2009, Ann. Neurol. 66: 617-629) 及び補体タンパク質とともに培養し、細胞媒介細胞傷害を実証した。次いで星状細胞破壊の遮断を実証するために抗C5抗体を加えて実験を繰り返した。

#### 【0376】

細胞死を定量するために、Cytotox - GluTM発光細胞傷害アッセイを行った。このアッセイは様々な濃度の抗C5抗体 (0.001 µg/ml、0.01 µg/ml、0.1 µg/ml、1 µg/ml、10 µg/ml、100 µg/ml、又は1000 µg/ml) 又はアイソタイプコントロール抗体を使用した。

10

#### 【0377】

抗C5抗体がAQP4 - Ab誘導CDCを遮断することができるかどうかを決定するために、星状細胞をプレーティングし、そしてそのプレーティングに最適なAQP4 - Abの用量を発見するためにCytotox - GluTM細胞傷害アッセイを繰り返した。AQP4 - Ab最適濃度は50 µg/mLであることがわかり、そして以下の実験では、一定用量のAQP4 - Ab (50 µg/mL) を使用しながら抗C5抗体の用量を変化させた。図16に示されるように、抗C5抗体の量を増加させるにつれてRLUの減少が見られ (平均300kから平均100k)、抗C5抗体が星状細胞細胞死を遮断することを実証した。両方の実験について、RLUはアイソタイプコントロール抗体では変化しなかった。図16に示されるように、抗C5抗体はAQP4 - Ab誘導細胞傷害を初代皮質星状細胞において15 ~ 17 nMのIC50で阻害した。

20

#### 【0378】

その後の試験において、CNSにおける星状細胞の補体媒介細胞傷害に対する治療有効性を評価するために抗AQP4抗体及び抗C5抗体をラット脳に注入する。

#### 【0379】

実施例19：内皮アッセイ

この実施例は、抗C5抗体がC5b-9及びC3沈着を遮断するかどうかを調べるためのインビトロ系球体内皮アッセイを記載する。

30

#### 【0380】

補体活性化に対する薬物候補の阻害効果を評価するための再現可能な方法が全臨床開発に必須である。補体活性化経路の複雑性に起因して、アッセイは所定の治療適応症に適切な細胞及び評価項目を使用すべきである。ここでは、不死化ヒト系球体内皮細胞株 (HGE C) を使用して、補体C3及びC5沈着モデルを抗C3又はC5 mAbの遮断活性を評価する使用について実証した。

#### 【0381】

方法

ヒト初代腎臓系球体内皮細胞 (HGE C; Cell Biologics) を完全培地中でコラーゲンI被覆黒色透明底96ウェルプレートに終夜プレーティングした。細胞をPBS (対照) で処理するか又は10 µM ADPで10分間活性化した。PBS洗浄後に、50%ヒト血清 (補体保存、C3欠乏、又はC5欠乏) を4時間加えた。抗C5抗体を処置前に1 mg/mLで血清に加えた。細胞を洗浄し、固定化し、そして抗C3b抗体 (ThermoFisher) 及び/又は抗C5b-9抗体 (Abcam)、二次抗体を用いて調べ、そしてDAPIを用いて対比染色した。画像をImageExpressで記録し、そしてハイコンテント画像解析を使用して各画像について蛍光染色を定量し、そして条件ごとに平均した。

40

#### 【0382】

結果

C3及びC5b-9沈着が正常ヒト血清に曝露されたADP活性化HGE Cで観察された

50

が、非活性化HGE Cでは観察されなかった( $C3: 1.5 \times 10^7 \pm 1.0 \times 10^7$ ;  $C5: 7.9 \times 10^6 \pm 6.6 \times 10^6$ 、 $P < 0.05$  対非ADP活性化HGE C)。C3及びC5b-9の沈着はC3又はC5欠乏血清に曝露されたADP活性化HGE Cにおいて有意に減少された( $C3: 3.3 \times 10^5 \pm 4.8 \times 10^4$ ;  $C5: 1.5 \times 10^6 \pm 6.0 \times 10^5$ 、 $P < 0.05$ )。遮断抗C5 mAbを加えることにより、ADP活性化HGE C上への正常ヒト血清由来C5b-9沈着を有意に減少し、沈着はC5欠乏血清と同様であった( $C5\ mAb: 1.02 \times 10^6 \pm 6.0 \times 10^5$ 、対照 mAb  $3.7 \times 10^6 \pm 1.6 \times 10^6$ 、 $P < 0.05$  対対照 mAb)。

#### 【0383】

##### 結論

これらのデータは、補体C3及びC5沈着のモデルを作るためのインビトロヒト系球体沈着の有用性を実証する。インビトロスクリーニングに加えて、このアッセイは、患者由来の血清サンプルを使用して腎疾患における抗補体ストラテジーを評価するための翻訳モデルとしての可能性を示す。

#### 【0384】

本発明は、本明細書に記載される特定の実施態様により範囲を限定されるべきではない。実際に、本明細書に記載されるものに加えて本発明の様々な改変が、前述の記載及び添付の図面から当業者に明らかとなるだろう。このような改変は添付の特許請求の範囲内であることが意図される。

10

20

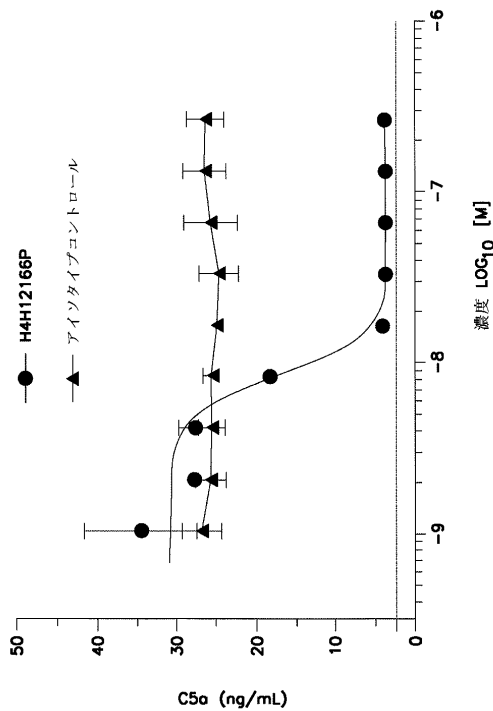
30

40

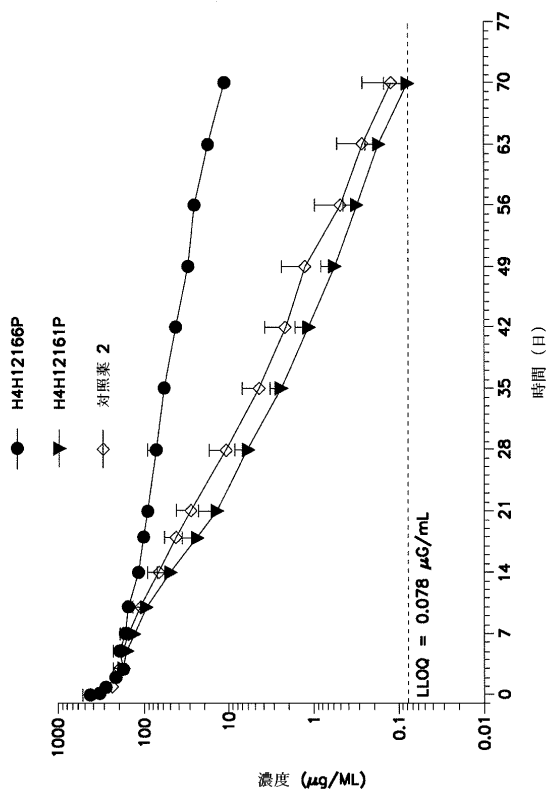
50

【図面】

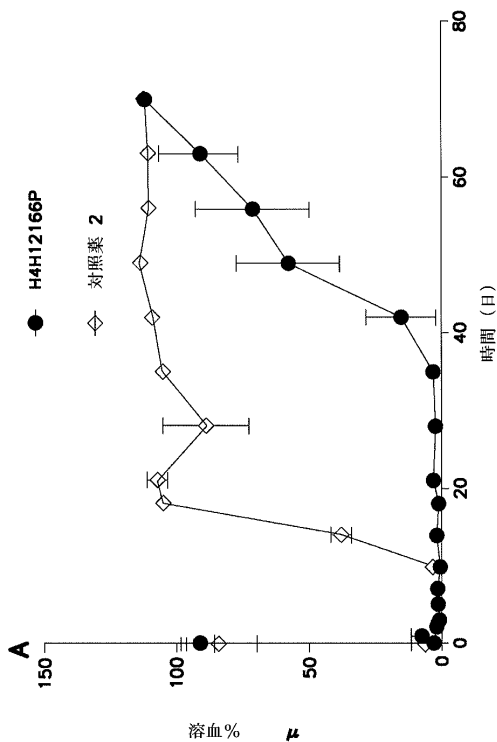
【図 1】



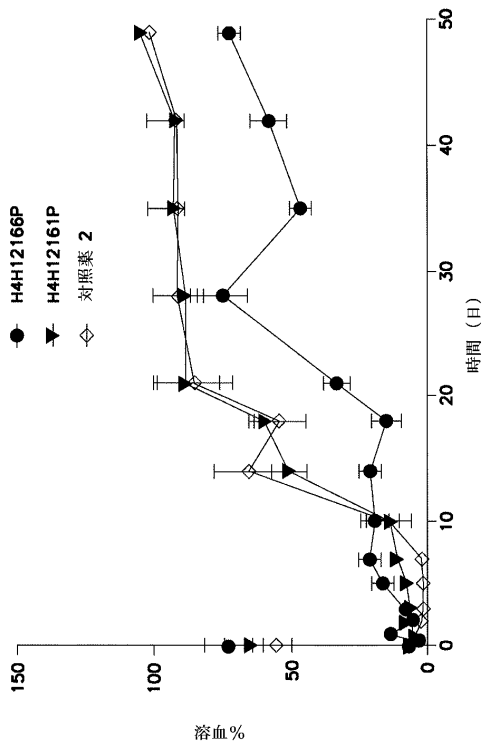
【図 2】



【図 3 A】



【図 3 B】



10

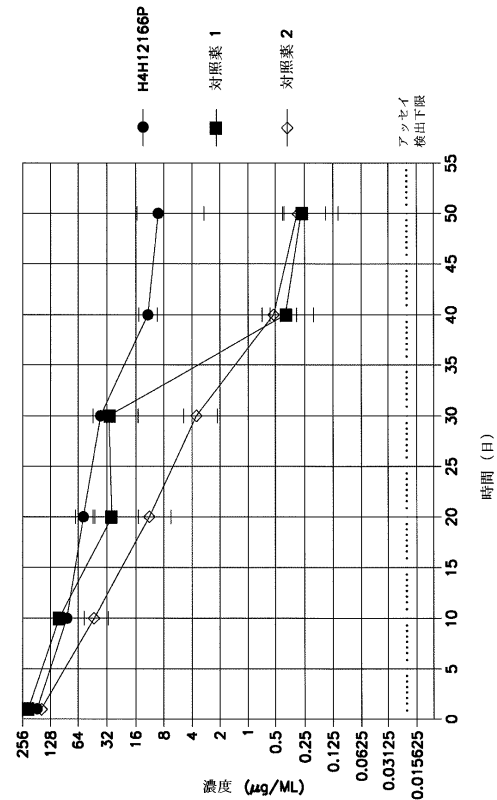
20

30

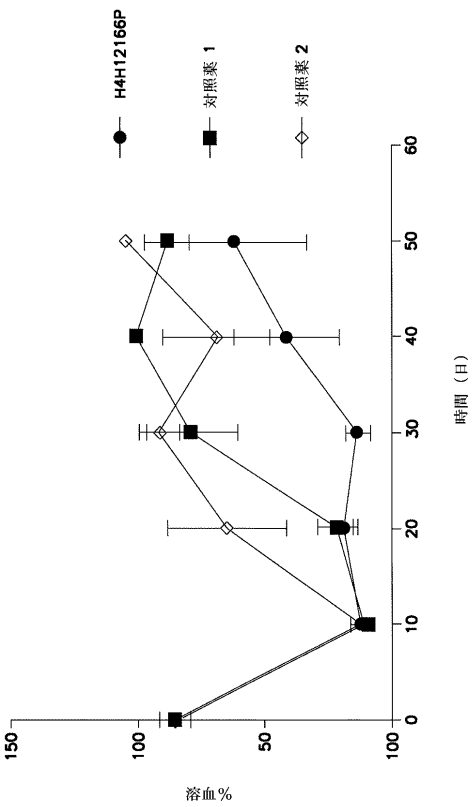
40

50

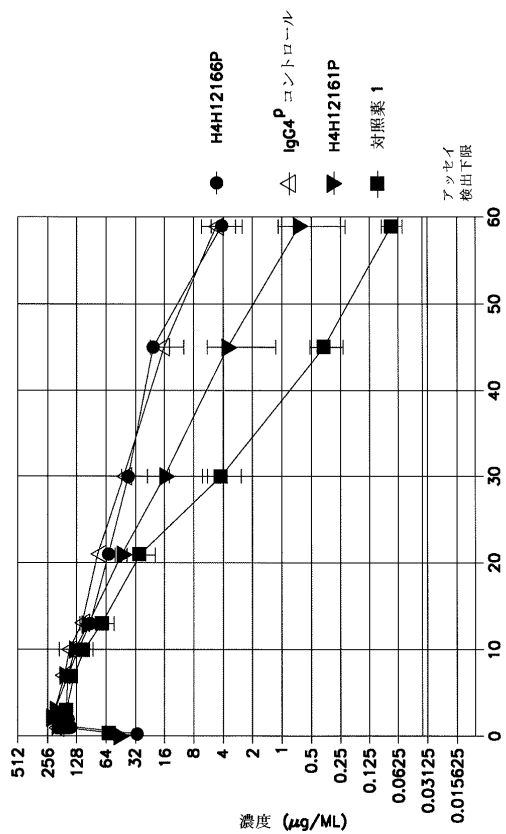
【 図 4 】



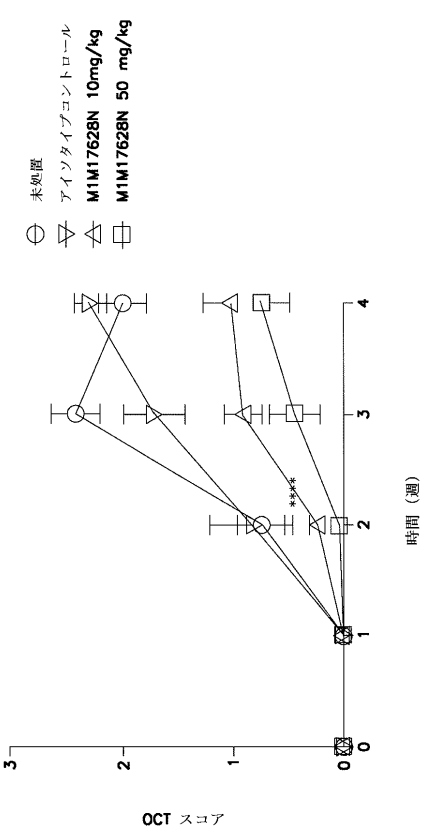
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



10

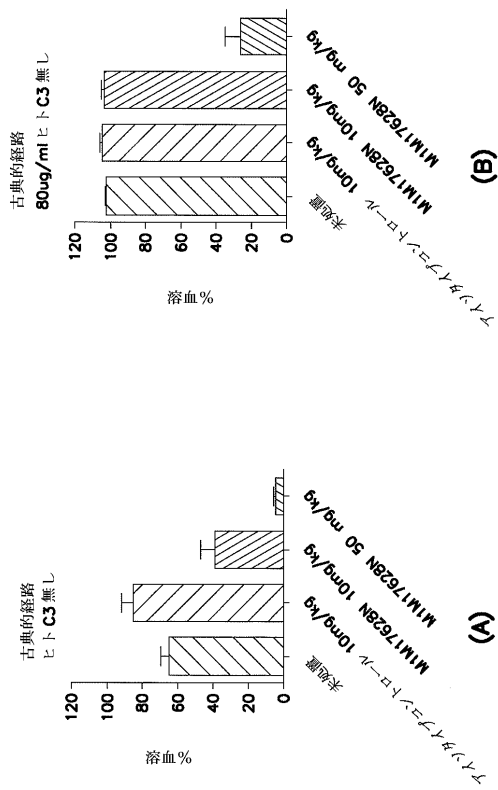
20

30

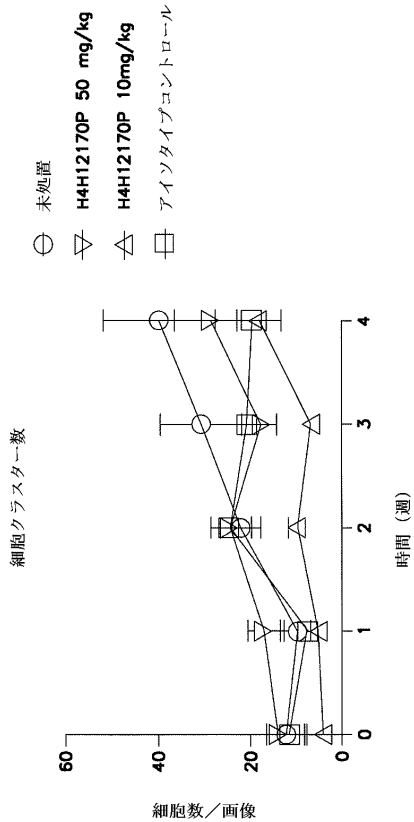
40

50

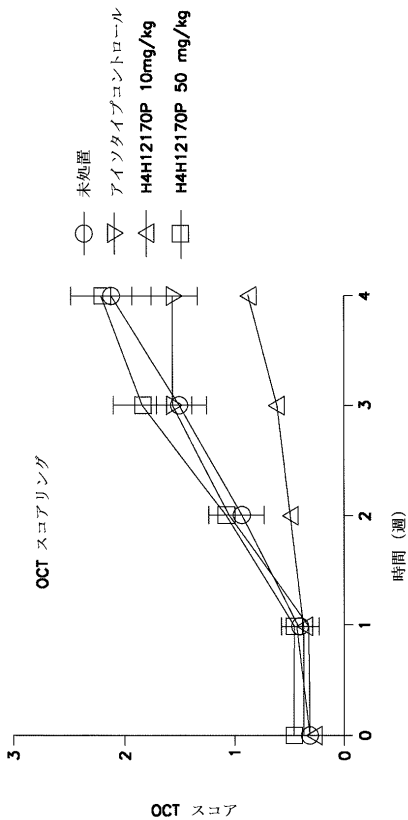
【図 8】



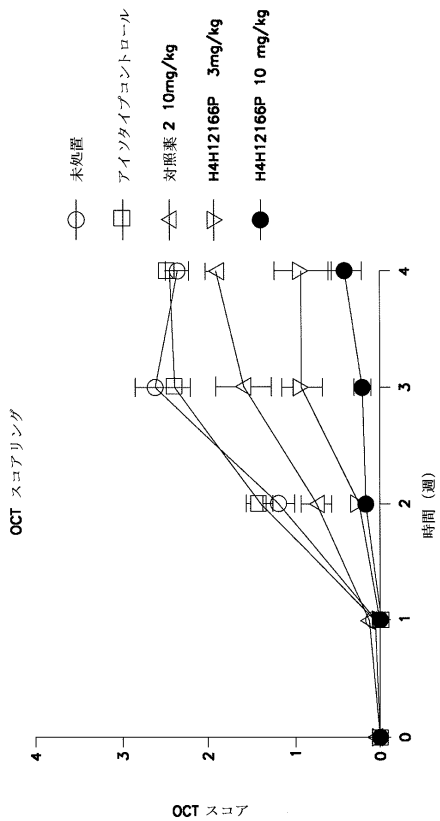
【図 9】



【図 10】



【図 11】



10

20

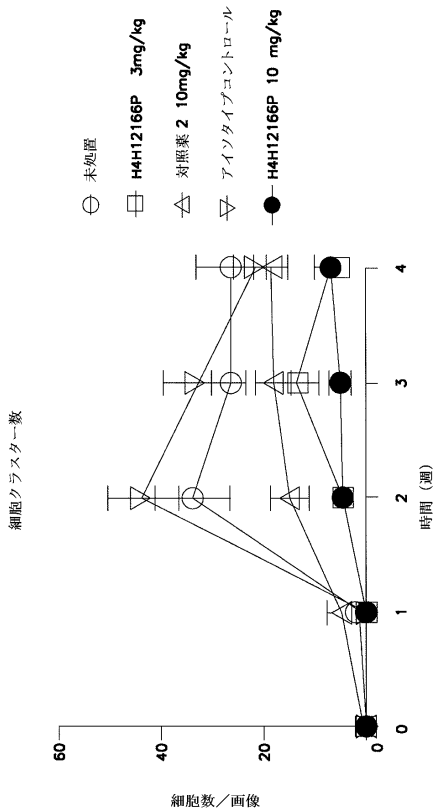
30

40

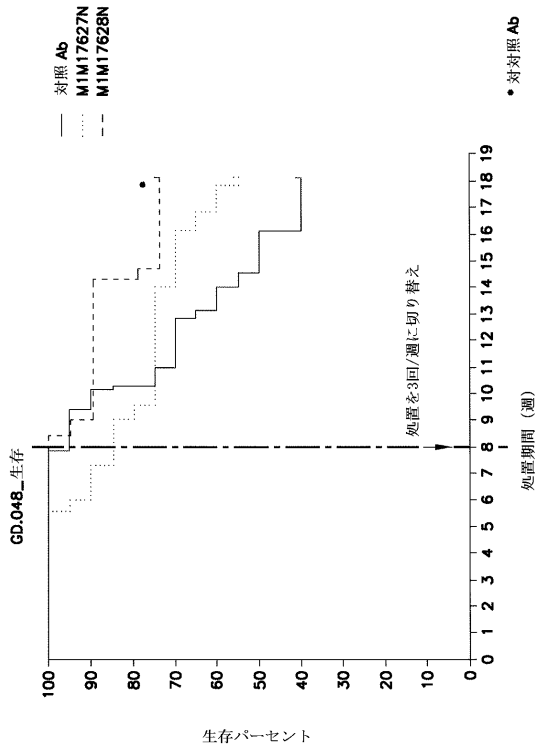
50



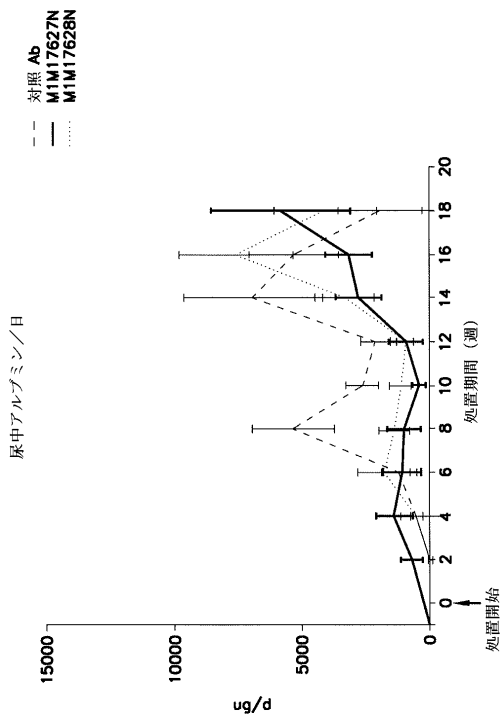
【図 1 2】



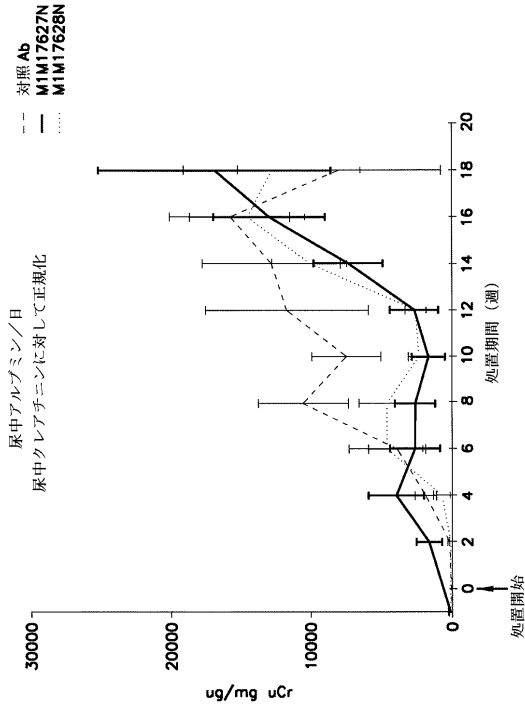
【図 1 3】



【図 1 4 A】



【図 1 4 B】



10

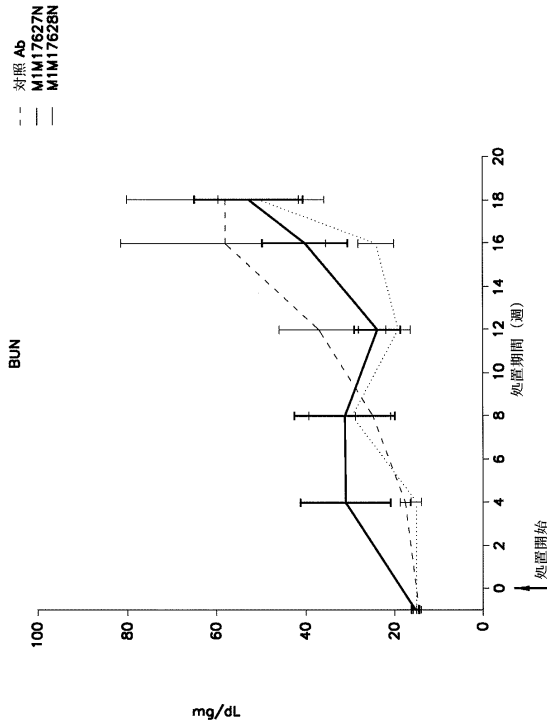
20

30

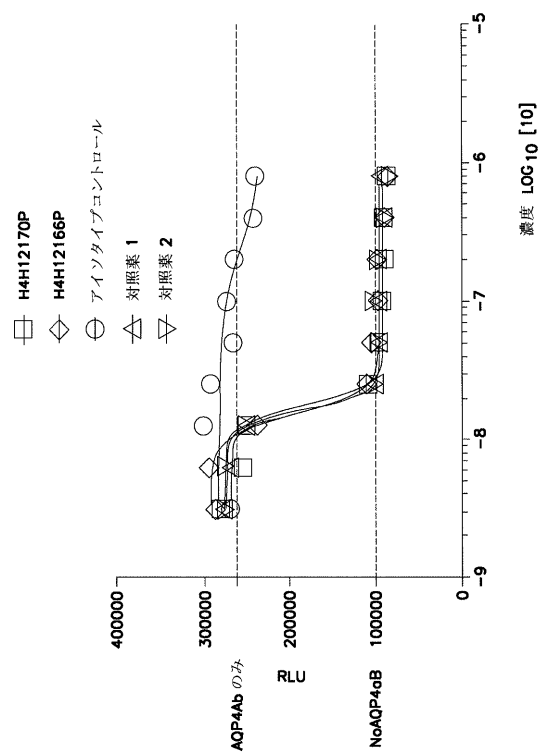
40

50

【表 15】



【表 16】



【配列表】

0007102353000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

|         |       |           |         |       |       |
|---------|-------|-----------|---------|-------|-------|
| A 6 1 P | 25/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 25/00 |       |
| A 6 1 P | 9/00  | (2006.01) | A 6 1 P | 9/00  |       |
| A 6 1 P | 25/28 | (2006.01) | A 6 1 P | 25/28 |       |
| A 6 1 P | 25/16 | (2006.01) | A 6 1 P | 25/16 |       |
| A 6 1 P | 7/00  | (2006.01) | A 6 1 P | 7/00  |       |
| A 6 1 P | 37/06 | (2006.01) | A 6 1 P | 37/06 |       |
| A 6 1 P | 29/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 29/00 |       |
| A 6 1 P | 1/04  | (2006.01) | A 6 1 P | 1/04  |       |
| A 6 1 P | 11/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 11/00 |       |
| A 6 1 P | 17/02 | (2006.01) | A 6 1 P | 17/02 |       |
| A 6 1 P | 9/10  | (2006.01) | A 6 1 P | 9/10  |       |
| A 6 1 P | 3/04  | (2006.01) | A 6 1 P | 3/04  |       |
| A 6 1 P | 3/10  | (2006.01) | A 6 1 P | 3/10  |       |
| A 6 1 P | 25/18 | (2006.01) | A 6 1 P | 25/18 |       |
| A 6 1 P | 25/08 | (2006.01) | A 6 1 P | 25/08 |       |
| A 6 1 P | 13/10 | (2006.01) | A 6 1 P | 9/10  | 1 0 1 |
| A 6 1 P | 31/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 13/10 |       |
| A 6 1 P | 31/04 | (2006.01) | A 6 1 P | 31/00 |       |
| A 6 1 P | 19/02 | (2006.01) | A 6 1 P | 31/04 |       |
| A 6 1 P | 37/02 | (2006.01) | A 6 1 P | 19/02 |       |
| A 6 1 P | 7/06  | (2006.01) | A 6 1 P | 37/02 |       |
| A 6 1 P | 11/06 | (2006.01) | A 6 1 P | 7/06  |       |
| A 6 1 P | 21/04 | (2006.01) | A 6 1 P | 11/06 |       |
| A 6 1 K | 45/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 21/04 |       |
| C 1 2 P | 21/08 | (2006.01) | A 6 1 K | 45/00 |       |
| C 1 2 N | 15/13 | (2006.01) | C 1 2 P | 21/08 |       |
|         |       |           | C 1 2 N | 15/13 |       |

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

## (31)優先権主張番号 62/422,107

## (32)優先日 平成28年11月15日(2016.11.15)

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

## 前置審査

バーロード 7 7 7

## (72)発明者 アドリアーナ・ラトゥーゼク

アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 9 1 . タリータウン . オールドソーミルリバーロード 7 7 7

## (72)発明者 カルメーロ・ロマーノ

アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 9 1 . タリータウン . オールドソーミルリバーロード 7 7 7

## (72)発明者 ウィリアム・オルソン

アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 9 1 . タリータウン . オールドソーミルリバーロード 7 7 7

審査官 竹内 祐樹

## (56)参考文献 特表 2 0 1 1 - 5 2 9 7 0 0 ( J P , A )

国際公開第 2 0 1 4 / 0 4 7 5 0 0 ( W O , A 1 )

TRANSLATIONAL RESEARCH, NL, 2015年02月, VOL:165, NR:2, PAGE(S):306 - 320

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 9 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d