

(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

C 0 7 K	16/18 (2006.01)	F I	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 R E G E N E R O N P H A R M A C E U T I C A L S , I N C . 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C 5 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) エクスピ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 (C P) 溶血を遮断する；
 (c) エクスピ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 (A P) 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) C 5 - 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) エクスピボ溶血アッセイで測定して、C 5 - ヒト化マウスへの投与の際に 30 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 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。

【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 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で測定して、 37 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で測定して、 65 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で測定して、 0.5 nM 未満の K D でヒト C 5 変異体 R 885H (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 nM 未満の K D でヒト C 5 変異体 R 885C (配列番号 357) に結合する；
 (g) C P 溶血アッセイで測定して、 6 nM 未満の I C 50 で 95 % 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、 165 nM 未満の I C 50 で 70 % 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、 185 nM 未満の I C 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、 235 nM 未満の I C 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、 145 nM 未満の I C 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、 30 nM 未満の I C 50 でカニクイザル C 5 媒介 A P 溶血を阻害する

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。

【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。

10

20

30

40

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。

10

【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。

20

【請求項 14】

C5に関連する疾患又は障害の少なくとも1つの症状又は徵候を予防するか、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、クローニ病、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(SEL)、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。

30

【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。

40

【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。

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C D 2 0 薬、リツキシマブ、抗T N F 薬、インフリキシマブ、抗痙攣薬、C 3 阻害剤、第二の抗C 5 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P C T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C 5 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。補体力スケードの3つの経路全てが補体成分5(C 5)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(C 5)の切断は、補体力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C 5 a及びC 5 bの生成をもたらす。C 5 a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)。C 5 a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。C 5 bは膜侵襲複合体(M A C 、又はC 5 b - 9)の形成を媒介し、補体依存性細胞障害(C D C)の後期に細胞溶解をもたらす。さらに、C 5 b - 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(s u b l y t i c)量のC 5 b - 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

【0004】

C 5 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。

40

【先行技術文献】**【特許文献】****【0005】**

50

【文献】米国特許第9206251号

米国特許第9107861号

米国特許第9079949号

米国特許第9051365号

米国特許第8999340号

米国特許第8883158号

米国特許第8241628号

米国特許第7999081号

米国特許第7432356号

米国特許第7361339号

米国特許第7279158号

米国特許第6534058号

米国特許第6355245号

米国特許第6074642号

米国特許公開第20160299305号

米国特許公開第20160051673号

米国特許公開第20160031975号

米国特許公開第20150158936号

米国特許公開第20140056888号

米国特許公開第20130022615号

米国特許公開第20120308559号

WO 2015198243

WO 2015134894

WO 2015120130

EP 2563813 B1

EP 2328616 B1

EP 2061810 B1

【非特許文献】

【0006】

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

9 - 448

30

【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つの症状又は徵候を予防するか、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。

40

50

〔 0 0 0 9 〕

本発明の抗体は全長（例えば、IgG1又はIgG4抗体）であっても、抗原結合部分（例えば、Fab、F(ab')₂又はscFv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（Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164: 1925-1933）。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、C5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。

【 0 0 1 1 】

本発明の例となる抗C5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C5抗体の、重鎖可変領域(HCVR)、軽鎖可変領域(LCVR)、重鎖相補性決定領域(HCDR1、HCDR2及びHCDR3)、及び軽鎖相補性決定領域(LCDR1、LCDR2及びLCDR3)のアミノ酸配列識別子を示す。表2は、例となる抗C5抗体のHCVR、LCVR、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3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90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも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。

【 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 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % 又は少なくとも 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 】

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。

10

【 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。

20

【 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 】

30

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。

40

【 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

50

は抗原結合フラグメントを提供し、該 L 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 L 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 L 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 L C D R 3 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、配列番号 1 0 0 のアミノ酸配列又は配列番号 1 0 0 と 1 アミノ酸異なるアミノ酸配列を含む H C D R 1 、配列番号 1 0 2 のアミノ酸配列又は配列番号 1 0 2 と 1 アミノ酸異なるアミノ酸配列を含む H C D R 2 、及び配列番号 1 0 4 のアミノ酸配列又は配列番号 1 0 4 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。別の例となる実施態様において、本発明は、 H C V R 及び L C V R を含む抗体又はその抗原結合フラグメントを提供し、該 L C V R は、配列番号 1 0 8 のアミノ酸配列又は配列番号 1 0 8 と 1 アミノ酸異なるアミノ酸配列を含む L C D R 1 、配列番号 1 1 0 のアミノ酸配列又は配列番号 1 1 0 と 1 アミノ酸異なるアミノ酸配列を含む L C D R 2 、及び配列番号 1 1 2 のアミノ酸配列又は配列番号 1 1 2 と 1 アミノ酸異なるアミノ酸配列を含む L C D R 3 を含む。

【 0 0 2 3 】

本発明は、配列番号 3 5 3 のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、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。

【 0 0 2 4 】

本発明はまた、配列番号 3 5 4 のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、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。

【 0 0 2 5 】

特定の実施態様において、本発明は、配列番号 3 5 3 のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも 8 0 % 、もしくは少なくとも 9 0 % 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 3 5 4 のアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも 8 0 % 、もしくは少なくとも 9 0 % 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。

【 0 0 2 6 】

本発明はまた、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 6 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 - L C D R 1 - L C D R 2 - 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。特定の実施態様において、 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 - L C D R 3 アミノ酸配列セットは、配列番号 5 2 - 5 4 - 5 6 - 6 0 - 6 2 - 6 4 （例えば、 H 4 H 1 2 1 6 1 P ）、 1 0 0 - 1 0 2 - 1 0 4 - 1 0 8 - 1 1 0 - 1 1 2 （例えば、 H 4 H 1 2 1 6 6 P ）、 1 4 0 - 1 4 2 - 1 4 4 - 1 0 8 - 1 1 0 - 1 1 2 （例えば、 H 4 H 1 2 1 6 6 P 5 ）、及び 2 0 4 - 2 0 6 - 2 0 8 - 2 1 2 - 2 1 4 - 2 1 6 （例えば、 H 4 H 1 2 1 7 0 P ）からなる群より選択される。

【 0 0 2 7 】

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 C 5 抗体のいずれかにより定義される H C V R / L C V R アミノ酸配列対内に含有される 6 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 - L C D R 1 - L C D R 2 - 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。例えば、本発明は、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 ）からなる群より選択される H C V R / L C V R アミノ酸配列対内に含有される 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 - L C D R 3 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。 H C V R 及び

10

20

30

40

50

L C V R アミノ酸配列内の C D R 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 H C V R 及び / 又は L C V R アミノ酸配列内の C D R を同定するために使用され得る。C D R 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、Kabat 定義、Chothia 定義、及び AbM 定義が挙げられる。一般的には、Kabat 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 Kabat 及び Chothia アプローチの間の折衷である。例えば、Kabat、「Sequences of Proteins 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. U S A 86: 9268 - 9272 (1989) を参照のこと。公開データベースも抗体内の C D R 配列を同定するために利用可能である。

【0028】

特定の実施態様において、本発明は、C 5 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 (H C V R) 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) 及び軽鎖可変領域 (L C V R) 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) を含み、ここで H C V R 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 L C V R 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(v) 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。

【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 C 5 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。

【0030】

特定の実施態様において、本発明は、C 5 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 C 5 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 C 5 抗体を提供する。特定の実施態様において、本発明の抗 C 5 抗体は、C 5 ヒト化マウスにおいて 40 日目まで 10 μg / 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 C 5 抗体は、C 5 ヒト化マウスへの投与の際に、35 日目まで C P 溶血及び A P 溶血を遮断する。

【0032】

本発明はまた、H C V R の C D R 及び L C V R の C D R を含む抗体又はその抗原結合フラグメントと C 5 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 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。

10

20

30

40

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 を含む参考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 を含む参考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 を含む参考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

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。

10

【 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 nM 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 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 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、25 で 0 . 9 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で測定して、37 で 0 . 3 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で測定して、65 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で測定して、0 . 5 nM 未満の K D でヒト C 5 変異体 R 885H (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 nM 未満の K D でヒト C 5 変異体 R 885C (配列番号 357) に結合する；(g) C P 溶血アッセイで測定して、6 nM 未満の IC 50 で 95 % 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、165 nM 未満の IC 50 で 70 % 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、185 nM 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、235 nM 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、145 nM 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、30 nM 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。

20

【 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 100 - 102 - 104 - 108 - 110 - 112 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、25 で 0 . 2 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で測定して、37 で 0 . 3 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で測定して、37 で 0 . 4 nM 未満の K D でヒト C 5 変異体 (R 885H) に結合する；(e) 3 nM 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) 27 nM 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) 21 nM 未満の IC 50 でサル血清の C P 媒介溶血を阻害する；(g) 10 nM 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 10 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 40 日目まで 10 μg / mL 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 50 日まで C P 媒介溶血を遮断する；並びに(k) 配列番号 359 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

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。

20

【 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產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 つの症状もしくは徵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（co-formulations）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つの症状又は徵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）。

30

【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-時間プロフィールを、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、LLQ/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。LLQ=定量下限。

【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、エクスピボ赤血球（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、エクスピボ赤血球（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 1 1 に記載される）。ヒト化 C 5 マウスに、H 4 H 1 2 1 6 6 P、対照薬 1 又は対照薬 2 の単回 1 5 m g / k g 皮下用量を投与した。各データ点は平均 ± 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 、 1 0 、 2 0 、 3 0 及び 4 0 日後にモニタリングした。

【図 5 】図 5 は、C 5 についてヒト化されたマウスにおける選択された抗 C 5 抗体のエクスピ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 C 5 マウスに、H 4 H 1 2 1 6 6 P、対照薬 1 又は対照薬 2 の単回 1 5 m g / k g 皮下用量を投与した。各データ点は平均 ± 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 1 0 、 2 0 、 3 0 、 4 0 及び 5 0 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 C 5 抗体により阻害された C 5 の量に関連する。
10

【図 6 】図 6 は、C 5 についてヒト化されたマウスにおける選択された抗 C 5 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 1 1 に記載される）。マウスに H 4 H 1 2 1 6 6 P、H 4 H 1 2 1 6 1 P、対照薬 1 又は Ig G 4 P アイソタイプコントロールの単回 1 5 m g / k g 皮下用量を投与した。各データ点は平均 ± 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 、 1 0 、 1 4 、 2 1 、 3 0 、 4 5 及び 5 9 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 C 5 抗体 M 1 M 1 7 6 2 8 N で 1 0 m g / k g 又は 5 0 m g / k g で処置されたマウスにおける光干渉断層撮影（O C T ）スコアを示すグラフである（本明細書の実施例 1 4 に記載される）。 * * * * p < 0 . 0 0 0 1 、両側 A N O V A 5 0 m g / k g での抗 C 5 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、C 3 の存在しない場合（A）；及び 8 0 μ g / m L のヒト C 3 の存在下（B）での抗 C 5 抗体 M 1 M 1 7 6 2 8 N による古典的経路溶血の阻害を示す（本明細書の実施例 1 4 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 C 5 抗体 H 4 H 1 2 1 7 0 P 1 0 m g / k g 又は 5 0 m g / k g で処置された C 5 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 1 5 に記載される）。各群について n = 8 ~ 1 2 の眼。
30

【図 1 0 】図 1 0 は、アイソタイプコントロール又は抗ヒト C 5 抗体 H 4 H 1 2 1 7 0 P 1 0 m g / k g 又は 5 0 m g / k g で処置された C 5 ヒト化マウスにおける O C T スコアを示すグラフである（本明細書の実施例 1 5 に記載される）。各群について n = 8 ~ 1 2 の眼。

【図 1 1 】図 1 1 は、アイソタイプコントロール、3 m g / k g 又は 1 0 m g / k g での抗ヒト C 5 抗体 H 4 H 1 2 1 6 6 P、又は対照薬 2 1 0 m g / k g で処置された C 5 ヒト化マウスにおける O C T スコアを示すグラフである。各群について n = 6 ~ 1 2 の眼（本明細書の実施例 1 5 に記載される）。

【図 1 2 】図 1 2 は、アイソタイプコントロール、抗ヒト C 5 抗体 H 4 H 1 2 1 6 6 P 3 m g / k g もしくは 1 0 m g / k g 、又は対照薬 2 1 0 m g / k g で処置された C 5 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 ~ 1 2 の眼（本明細書の実施例 1 5 に記載される）。

【図 1 3 】図 1 3 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 マウスの生存曲線である（本明細書の実施例 1 7 に記載される）。

【図 1 4 A 】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）。

10

20

30

40

50

【図14B】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)。

【図15】図15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(本明細書の実施例17に記載される)で処置されたNZBWF1マウスにおける血中尿素窒素のレベルを示す。

【図16】図16は、実施例18に記載されるように、抗C5抗体H4H12166P、H4H12170P、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。

10

【発明を実施するための形態】

【0059】

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えるので、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。

【0060】

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。

20

【0061】

定義

「補体成分5」又は「補体因子5」とも呼ばれる用語「C5」は、補体カスケードの血清タンパク質を指す。C5タンパク質は、2つの鎖アルファ及びベータを含む1676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C5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「C5」は組み換えC5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C5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C5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C5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。

30

【0062】

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(「HCVR」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(「LCVR」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

40

50

に以下の順序で配置された 3 つの C D R 及び 4 つの F R から構成される： F R 1 、 C D R 1 、 F R 2 、 C D R 2 、 F R 3 、 C D R 3 、 F R 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 F R 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 C D R の対照（ side - by - side ）解析に基づいて定義され得る。

【 0 0 6 3 】

1 つもしくはそれ以上の C D R 残基の置換又は 1 つもしくはそれ以上の C D R の削除も可能である。1 つ又は 2 つの C D R 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 C D R 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 C D R 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

【 0 0 6 4 】

抗原と接触していない C D R 残基は、分子モデリングにより及び / 又は経験的に Chothia C D R の外側にある Kabat C D R 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 H 60 ~ H 65 はしばしば必要ない）。C D R 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。C D R 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

【 0 0 6 5 】

本明細書に開示される完全ヒト抗 C 5 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 C D R 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 C D R 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 H 及び / 又は V L ドメイン内の全てのフレームワーク及び / 又は C D R 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、F R 1 の最初の 8 つのアミノ酸内もしくは F R 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 C D R 1 、 C D R 2 もしくは C D R 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 C D R 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 C D R 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

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。

【 0 0 6 6 】

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C 5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C 5抗体を含む。

【 0 0 6 7 】

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m A b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、インビ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ビオ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m A b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產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。

【 0 0 6 8 】

本明細書において使用される用語「組み換え（体）」は、例えば、D N A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D N A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、C H O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。

【 0 0 6 9 】

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、生理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 1×10^{-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、C 5に特異的に結合する。さらに、C 5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（m u l t i - s p e c i f i c）抗体、又はC 5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。

【 0 0 7 0 】

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C 5に対する結合親和性を有するm A bを指す。

【 0 0 7 1 】

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、 1×10^{-3} s⁻¹又はそれ以下、好ましくは 1×10^{-4} s⁻¹又はそれ以下の速度定数でC 5から解離する抗体を意味する。

【 0 0 7 2 】

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、BIA CORE TM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「KD」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。

30

【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效果を有し得る。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。

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、F A S T A、B L A S T 又はG A P 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99%においてヌクレオチド配列同一性があることを示す。参考核酸分子に対して実質的な同一性を有する核酸分子は、特定の例において、参考核酸分子によりコードされるポリペプチドと同じかまたは実質的に類似したアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし得る。

【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G A P 又はB E S T F I T 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、なに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 - ヒドロキシリ側鎖：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。

【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、G C G ソフトウェアはG A P 及びB E S T F I T 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、G C G バージョン6.1を参照のこと。ポリペプチド配列はまた、F A S T A 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；G C G バージョン6.1中のプログラム。F A S T A （例えば、F A S T A 2 及びF A S T A 3 ）は、クエリー配列と検索配列との間の最

10

20

30

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)。

10

【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 つの症状又は徵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 / 徵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。

20

【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徵候の出現を、本発明の抗体の投与の際に阻害することを指す。

【0087】

30

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')₂ 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

40

50

、又はコドンを導入するか、システィ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。

【 0 0 8 8 】

抗原結合フラグメントの非限定的な例としては：(i) F a b フラグメント；(i i) F (a b ') 2 フラグメント；(i i i) F d フラグメント；(i v) F v フラグメント；(v) 単鎖 F v (s c F v) 分子；(v i) d A b フラグメント；及び(v i i) 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、 C D R 3 ペプチドのような単離された相補性決定領域（ C D R ））、又は拘束性 F R 3 - C D R 3 - F R 4 ペプチドが挙げられる。ドメイン特異的抗体、單一ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、 C D R - グラフト化抗体、二重特異性抗体（ d i a b o d i e s ）、三重特異性抗体（ t r i a b o d i e s ）、四重特異性抗体（ t e t r a b o d i e s ）、ミニボディ（ m i n i b o d i e s ）、ナノボディ（ n a n o b o d i e s ）（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（ s m a l l m o d u l a r i m m u n o p h a r m a c e u t i c a l s ）（ S M I P ）、及びサメ可変 I g N A R ド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。10

【 0 0 8 9 】

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もよく、そして一般的には少なくとも1つの C D R 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 L ドメインと関連する V H ドメインを有する抗原結合フラグメントにおいて、 V H 及び V L ドメインは、互いに対してもう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 H - V H 、 V H - V L 又は V L - V L 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 H 又は V L ドメインを含有し得る。20

【 0 0 9 0 】

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 H - C H 1 ；(i i) V H - C H 2 ；(i i i) V H - C H 3 ；(i v) V H - C H 1 - C H 2 ；(v) V H - C H 1 - C H 2 - C H 3 ；(v i) V H - C H 2 - C H 3 ；(v i i) V H - C L ；(v i i i) V L - C H 1 ；(i x) V L - C H 2 ；(x) V L - C H 3 ；(x i) V L - C H 1 - C H 2 ；(x i i) V L - C H 1 - C H 2 - C H 3 ；(x i i i) V L - C H 2 - C H 3 ；及び(x i v) V L - C L 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 H もしくは V L 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。30

【 0 0 9 1 】

完全抗体分子のように、抗原結合フラグメントは、单一特異的又は多選択性（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す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。40

【 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 N P _ 0 0 1 7 2 6 . 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 . c o l i 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、U S 6 , 5 9 6 , 5 4 1 、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髄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、患者が参考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關しており、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。

【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。

【0107】

本発明はまた、キメラ重鎖定常(C_H)領域を含む抗C5抗体を含み、ここでキメラC_H領域は、1つより多くの免疫グロブリンアイソタイプのC_H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C_H3ドメインの一部又は全てと組み合わされた、ヒトIgG1、ヒトIgG2又はヒトIgG4分子から誘導されたC_H2ドメインの一部又はすべてを含むキメラC_H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C_H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)と組み合わされた、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227のアミノ酸残基)を含み得る。特定の実施態様によれば、キメラヒンジ領域は、ヒトIgG1又はヒトIgG4上部ヒンジから誘導されたアミノ酸残基及びヒトIgG2下部ヒンジから誘導されたアミノ酸残基を含む。本明細書に記載されるキメラC_H領域を含む抗体は、特定の実施態様において、抗体の治療的特性又は薬物動態特性に不利な影響を及ぼさずに改変されたFcエフェクター機能を示し得る。(例えば、米国特許出願公開第2014/0243504号(その開示は参照によりその全体として本明細書に加入される)を参照のこと)。

【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

10

20

30

40

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、25又は37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 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。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 nM未満、約5 nM未満、約2 nM未満、約1 nM未満、約500 pM、250 pM未満、又は100 pM未満のK_DでC 5に結合する。

【0109】

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25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、mAb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25で測定して、約5分より長い、約10分より長い、約30分より長い、約50分より長い、約100分より長い、約150分より長い、約200分より長い、又は約250分より長いt_{1/2}でC 5 タンパク質に結合する。

10

【0110】

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37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、本明細書の実施例において規定されるアッセイ形式（例えば、mAb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37で測定して、約2分より長い、約5分より長い、約10分より長い、約25分より長い、約50分より長い、約100分より長い、約150分より長い、又は約200分より長いt_{1/2}でC 5 タンパク質に結合する。

20

【0111】

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、120 nM未満のK_DでサルC 5 タンパク質に（例えば、25又は37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120 nM未満、約100 nM未満、約50 nM未満、約25 nM未満、約10 nM未満、約5 nM未満、約1 nM未満、約500 pM、又は250 pM未満のK_DでサルC 5 に結合する。

30

【0112】

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70 nM未満のK_Dで、R885H変化（配列番号356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、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65 nM未満、約50 nM未満、約20 nM未満、約10 nM未満、約5 nM未満、約3 nM未満、又は2 nM未満のK_Dで改変されたヒトC 5 に結合する。

40

【0113】

本発明はまた、R885C変化を有する改変されたヒトC 5 タンパク質（配列番号357

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160nM未満のKD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150nM未満、約100nM未満、約50nM未満、約20nM未満、約10nM未満、約5nM未満、又は2nM未満のKDで改変されたヒトC5に結合する。

【0114】

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、10nM未満のIC50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5nM未満、約3.5nM未満、又は約2nM未満のIC50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6nM未満のIC50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6nM未満、約5nM未満、約4nM未満、約3nM未満、又は約2nM未満のIC50でCP溶血を遮断する。

【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165nM未満のIC50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160nM未満、約150nM未満、約100nM未満、約50nM未満、又は約20nM未満のIC50でAP溶血を遮断する。

【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185nM未満のIC50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180nM未満、約150nM未満、約100nM未満、約75nM、又は約50nM未満のIC50でCP溶血を遮断する。

【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、235nM未満のIC50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200nM未満、約150nM未満、約100nM未満、約50nM未満、又は約20nM未満のIC50でAP溶血を遮断する。

【0119】

10

20

30

40

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 I C 5 0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 I C 5 0で C P 溶血を遮断する。

【 0 1 2 0 】

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 I C 5 0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 I C 5 0で A P 溶血を遮断する。

10

【 0 1 2 1 】

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 (PK) 及び薬力学 (PD) 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

【 0 1 2 2 】

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 D) 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

【 0 1 2 3 】

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 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、37°で0.3 nM未満の K D 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) エクスピ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) エクスピ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

【 0 1 2 4 】

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 D)

50

) 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 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において測定して、 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において測定して、 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において測定して、 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 溶血アッセイにおいて測定して、 6 n M 未満の I C 5 0 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 n M 未満の I C 5 0 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 n M 未満の I C 5 0 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 n M 未満の I C 5 0 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 n M 未満の I C 5 0 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 n M 未満の I C 5 0 でカニクイザル C 5 媒介 A P 溶血を阻害する。
10

【 0 1 2 5 】

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。

【 0 1 2 6 】

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 C 5 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 C 5 抗体を含む。抗体が結合するエピトープは、C 5 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 、 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 、 2 0 又はそれ以上) のアミノ酸の单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。
30

【 0 1 2 7 】

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 (2 0 0 4) Methods Mol. Biol. 2 4 8 : 4 4 3 - 6 3) 、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 (2 0 0 0) Prot. Sci. 9 : 4 8 7 - 4 9 6) 。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
40

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 ~ 1 0 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ィー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ー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 C 5 抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号 3 5 5 において例示される天然形態、又は組み換え產生された C 5 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 C 5 タンパク質のアミノ酸残基 1 9 ~ 1 6 7 6 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。

30

【 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 3 5 5 のおよそ位置 1 9 からおよそ位置 7 5 0 までの範囲に及ぶアミノ酸残基；又はおよそ位置 7 5 1 からおよそ位置 1 6 7 6 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。

【 0 1 3 2 】

特定の実施態様において、本発明は、 C 5 (配列番号 3 5 9) 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 C 5 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、 C 5 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 、 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 、 2 0 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、 C 5 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 1 1 に示されるように、本発明の例となる抗体 H 4 H 1 2 1 6 6 P が相互作用する C 5 のエピトープは： (i) 配列番号 3 5 9 のベータ鎖に含まれるアミノ酸 5 9 1 ~ 5 9 9 に対応するアミノ酸配列 N M A T G M D S W (配列番号 3 6 0) ；及び (i i) 配列番号 3 5 9 のアルファ鎖に含まれるアミノ酸 7 7 5 ~ 7 9 4 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 3 6 1) により定義される。従って、本発明は、 (i) 配列番号 3 5 9 のアミノ酸 5 9 1 ~ 5 9 9 に対応するアミノ酸配列 N M A T G M D S W (配列番号 3 6 0) ；及び (i i) 配列番号 3 5 9 のアミノ酸 7 7 5 ~ 7 9 4 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 3 6 1) か

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、又は参照抗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。

10

【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。

20

【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 hans 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。

30

【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。

40

【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

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、分子に沿ったいづ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 C 5 タンパク質に対する第二の異なる抗体であり得る。抗 C 5 抗体に結合され得る治療的部分の種類は、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 0 5 / 1 0 3 0 8 1 を参照のこと。

【0139】

10

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。

20

【0141】

いくつかの実施態様において、C 5 特異的抗体は、C 5 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、单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 C 5 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_H）は、そのV_Hに対する元の特異性を破壊することなく元のV_Hと対になることができる非同族V_L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_L）と再結合される。このようにして、単一V_Lセグメント（例えば、V_L 1）は、2つの異なるV_Hドメイン（例えば、V_H 1 及び V_H 2）と結合されて、2つの結合「アーム」（V_H 1 - V_L 1 及び V_H 2 - V_L 1）から構成される二重特異性を生じる。単一V_L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、USSN 13 / 022759 及び US 2010 / 0331527）。

30

【0142】

40

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 C 5 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 C 5 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、单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

50

ン (Ig) C_H3 ドメイン及び第二の Ig C_H3 ドメインの使用を含み、ここで第一及び第二の Ig C_H3 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 Ig C_H3 ドメインはプロテイン A に結合し、そして第二の Ig C_H3 ドメインは、H 95 R 改変 (IMGT エクソン番号付けによる； EU 番号付けでは H 435 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_H3 は Y 96 F 改変 (IMGT による； EU では Y 436 F) を更に含み得る。第二の C_H3 内に見られ得るさらなる改変としては： Ig G1 抗体の場合、D 16 E、L 18 M、N 44 S、K 52 N、V 57 M、及び V 82 I (IMGT による； EU では D 356 E、L 358 M、N 384 S、K 392 N、V 397 M、及び V 422 I) ； Ig G2 抗体の場合、N 44 S、K 52 N、及び V 82 I (EU では IMGT ; N 384 S、K 392 N、及び V 422 I) ；並びに Ig G4 抗体の場合、Q 15 R、N 44 S、K 52 N、V 57 M、R 69 K、E 79 Q、及び V 82 I (IMGT による； EU では Q 355 R、N 384 S、K 392 N、V 397 M、R 409 K、E 419 Q、及び V 422 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。

【0144】

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、scFv ベース又は二特異性抗体 (diabody) 二重特異性形式、IgG - scFv 融合物、二重可変ドメイン (DVD) - Ig、クアドローマ、ノブ・イントウ・ホール (knobs-into-holes)、共通軽鎖 (例えば、ノブ・イントウ・ホールとの共通軽鎖など)、CrossMab、CrossFab、(SEED) ボディ、ロイシンジッパー、Duobody、IgG1 / IgG2、二重作用 Fab (DAF) - IgG、及び Mab2 二重特異性形式 (前述の形式の概説については、例えば、Klein et al. 2012, mAbs 4 : 6, 1 - 11、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、Kazane et al. 、J. Am. Chem. Soc. [Publ : Dec. 4, 2012])。

【0145】

治療的投与及び製剤

本発明は、本発明の抗 C5 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： Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA。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、LIPOFECTINTM)、DNA 結合体、無水吸収ペースト、水中油及び油中水乳剤、carbowax 乳剤 (emulsions carbowax) (様々な分子量のポリエチレングリコール)、半固体ゲル、及び carbowax を含有する半固体混合物が挙げられる。Powell et al. 「Compendium of excipients for parenteral formulations」 PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52 : 238 - 311 も参照のこと。

【0146】

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は使用される場合、本発明の抗体を通常、約 0.1 ~ 約 100 mg / 体重 kg の単回用量、より好ましくは約 5 ~ 約 80、約 10 ~ 約 70、又は約 20 ~ 約 50 mg / 体重 kg

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0.1mg～約800mg、約1～約600mg、約5～約500mg、又は約10～約400mg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】

10

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、例えば注入又はボーラス注射により、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】

20

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】

30

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】

40

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、プロピレンギリコール、ポリエチレンギリコール）、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（50mol）付加物）〕などの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。

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。

【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、AUTOPEN™(Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK)、DISETRONIC™ペン(Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25™ペン、HUMALOG™ペン、HUMALIN 70/30™ペン(Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN)、NOVOPEN™I、II及びIII(Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、NOVOPEN JUNIOR™(Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、BD™ペン(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、OPTIPEN™、OPTIPEN PROT™、OPTIPEN STARLETT™、並びにOPTICLIKT™(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、SOLOSTART™ペン(Sanofi-Aventis)、FLEXOPEN™(Novo Nordisk)、及びKWIKPENT™(Eli Lilly)、SURECLICK™自動注射器(Amgen, Thousand Oaks, CA)、PENLET™(Haselmeier, Stuttgart, Germany)、EPIPEN(Dey, L.P.)及びHUMIRAT™ペン(Abbott Labs, Abbott Park, IL)が挙げられる。

【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500mgであり；特に注射剤の形態では、抗体は約5～約300mg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300mg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。

【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)の症状又は徵候を処置又は予防する際に有用である。aHUSの症状及び徵候としては、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

10

20

30

30

40

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、恶心／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）の症状又は徵候を処置又は予防する際に有用である。PNHの症状及び徵候としては、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つの症状又は徵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、不活性粉塵及び鉛物に起因する傷害（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つの症状又は徵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つの症状又は徵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／徵候の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（hazeiness）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、Amstler 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、又は不健康的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て使用され得、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、及びトロンビン阻害剤(例えば、アルガトロバン、レピルジン、ビバリルジン、又はダビガトラン)、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、シクロスボリン 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、-アミノカプロン酸、抗プラスミン-a1、プロスタサイクリン、及びデフィブロチド)、ヒドロキシメチルグルタルリル 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 C5 a 及び C5 b 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「～と組み合わせて」は、さらなる治療活性成分が、本発明の抗C5抗体の投与の前、抗C5抗体の投与と同時、又は抗C5抗体の投与後に投与され得ることを意味する。用語「～と組み合わせて」はまた抗C5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C5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、72時間前、60時間前、48時間前、36時間前、24時間前、12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、30分前、15分前、10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C5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、10分後、15分後、30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、12時間後、24時間後、36時間後、48時間後、60時間後、72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C5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C5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30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C5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る（例えば、抗C5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、单一投薬形態、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C5抗体の投与は、さらなる治療活性成分「と組み合わせた」抗C5抗体の投与とみなされる。

【 0 1 6 7 】

本発明は、本発明の抗C5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処方される（co-formulated）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C5抗体（又は抗C5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C5抗体（又は抗C5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C5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C5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C5抗体、続いて1又はそれ以上の二次用量の抗C5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C5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C5抗体の投与の時間的順序を指す。したがって、「初期用量」は処置レジメンの最初に投与される用量であ

10

20

30

40

50

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 ~ 4 10
8（例えば、1、 $1\frac{1}{2}$ 、2、 $2\frac{1}{2}$ 、3、 $3\frac{1}{2}$ 、4、 $4\frac{1}{2}$ 、5、 $5\frac{1}{2}$ 、6、 $6\frac{1}{2}$ 、7、 $7\frac{1}{2}$ 、8、 $8\frac{1}{2}$ 、9、 $9\frac{1}{2}$ 、10、 $10\frac{1}{2}$ 、11、 $11\frac{1}{2}$ 、12、 $12\frac{1}{2}$ 、13、 $13\frac{1}{2}$ 、14、 $14\frac{1}{2}$ 、15、 $15\frac{1}{2}$ 、16、 $16\frac{1}{2}$ 、17、 $17\frac{1}{2}$ 、18、 $18\frac{1}{2}$ 、19、 $19\frac{1}{2}$ 、20、 $20\frac{1}{2}$ 、21、 $21\frac{1}{2}$ 、22、 $22\frac{1}{2}$ 、23、 $23\frac{1}{2}$ 、24、 $24\frac{1}{2}$ 、25、 $25\frac{1}{2}$ 、26、 $26\frac{1}{2}$ 、又はそれ以上）時間後に投与される。本明細書で使用される句「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、単回のみの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、単回のみの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 抗体と接觸させることを含み、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}H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、若しくは ^{125}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、- 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

10

20

30

40

50

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。

30

【 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。

【 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

【0183】

実施態様8において、本発明は、補体因子5(C5)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359のN591、M592、A593、T594、G595、M596、D597、S598、W599、W775、E776、V777、H778、L779、V780、P781、R782、R783、K784、Q785、L786、Q787、F788、A789、L790、P791、D792、S793、又はL794。

【0184】

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70日目まで10μg/mLより高い血清濃度を有する；
(b)エクスピ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日目まで古典的経路(CP)溶血を遮断する；
(c)エクスピ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10μg/mLより高い血清濃度を有する；
(f)エクスピボ溶血アッセイにおいて測定して、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。

10

【0185】

実施態様10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、25で0.9nM未満の解離定数(KD)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0.3nM未満のKD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、65nM未満のKD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、0.5nM未満のKD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、0.5nM未満のKD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、6nM未満のIC50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、165nM未満のIC50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、185nM未満のIC50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、235nM未満のIC50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、145nM未満のIC50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、30nM未満のIC50でカニクイザルC5媒介AP溶血を阻害する。

20

【0186】

実施態様11において、本発明は、実施態様1～10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(HCVR)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(CDR)(HC DR1、HC DR2及びHC DR3)；及び表1に列挙される軽鎖可変領域(LCVR)配列のいずれか1つ内に含有される3つの軽鎖CDR(LCDR1、LCDR2及びLCDR3)を含む。

30

【0187】

実施態様12において、本発明は：(a)配列番号4、20、36、52、68、84、100、124、140、148、156、172、188、204、220、236、252、268、276、292、308、324、及び340からなる群より選択され

40

50

るアミノ酸配列を有する H C D R 1 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 H C D R 2 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 H C D R 3 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 L C D R 1 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 L C D R 2 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 L C D R 3 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 H C V R 配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する H C V R 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 L C V R 配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する L C V R 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 H C V R / L C V R 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 H C V R 内に含有される 3 つの C D R ; 並びに配列番号 58、106、及び 210 からなる群より選択される L C V R 内に含有される 3 つの C D R 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 】

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 C D R 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。
40

【 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 H C V R / L C V R 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 】

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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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つの症状又は徵候を予防するか、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

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。

30

【 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。

【 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、いくらかの実験誤差及び偏差が占めるはずである。特に示されていなければ、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 D N A 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 (Calbiotech 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。

【0216】

抗体免疫応答をC5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、C5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C5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H2M11683N及びH2M11686Nと名付けた。

【0217】

また抗C5抗体を、米国特許第7582298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C5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、H4H12159P、H4H12161P、H4H12163P、H4H12164P、H4H12166P、H4H12167P、H4H12168P、H4H12169P、H4H12170P、H4H12171P、H4H12175P、H4H12176P2、H4H12177P2及びH4H12183P2と指定した。

【0218】

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。

【0219】

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C5抗体の重鎖及び軽鎖可変領域並びにCDRのアミノ酸配列識別子を示す。

【0220】

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

10

20

30

40

【0221】

対応する核酸配列識別子を表2に示す。

【0222】

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

10

20

30

40

【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

50

し、そして「H 2 M」抗体は、マウス Ig G 2 Fc (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Ig G 1 Fcを有する抗体は、ヒトIg G 4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Ig G 1 Fcを有する選択された抗体を、ヒトIg G 4 Fcを有する抗体に転換した。一実施態様において、Ig G 4 FcドメインはU S 2 0 1 0 0 3 3 1 5 2 7に開示される2又はそれ以上のアミノ酸変化を含む。

【0225】

変異した抗体を生成するために、H 4 H 1 2 1 6 6 P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、H 4 H 1 2 1 6 6 P 2 ~ H 4 H 1 2 1 6 6 P 1 0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】

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C 5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「h 5 G 1 . 1」のVH/VL配列を有するヒトC 5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VH/VL配列を有するヒトC 5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C 5への抗体の結合

精製された抗C 5抗体へのC 5結合についての平衡解離定数(KD値)を、Biacore T 200機器で実時間表面プラズモン共鳴バイオセンサー(Accelerate)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C 5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 P 2 0)中で行った。ヒトC 5を商業的供給源(EMD)から入手した。C末端myc-myc-c-ヘキサヒスチジンタグを有する他のC 5試薬を発見させた(以後C 5-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C 5-mmh試薬も発見させた(以後それぞれC 5 R 885 H-mmh及びC 5 R 885 C-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C 5、ヒトC 5 R 885 H-mmh(配列番号356)、ヒトC 5 R 885 C-mmh(配列番号357)及びサルC 5-mmh(配列番号358)(100nM~1.23nMの範囲に及ぶ、3倍希釈)を、抗C 5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C 5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のいずれかで行った。動力学的結合(ka)及び解離(kd)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 2.0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(KD)及び解離半減期(t1/2)を、動力学的速度定数から:

10

20

30

40

50

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

【0228】

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的パラメーターを表 3 及び 4 に示す。

【0229】

【表 3】

表 3 : 25°Cでのヒト C5 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 抗体の量 (RU)	100nM 結合 したヒト C5 (RU)	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
			(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

【0230】

10

20

30

40

50

【表4】

表4：37°CでのヒトC5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	捕捉された抗体の量 (RU)	100nM 結合したヒトC5 (RU)	k_a	k_d	K_D	t%
			(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

10

20

30

40

【0231】

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

【0232】

【表 5】

表5：25°C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	捕捉された抗体の量 (RU)	100nM 結合したサルC5-mmh (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_b (M)	t½ (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；* SS=定常状態解析

10

20

30

40

【0 2 3 3】

50

【表 6】

表6：37°CでのサルC5-mm h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 抗体の量 (RU)	100nM 結合 したサル C5-mm h	<i>ka</i>	<i>kd</i>	KD	t½
			(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

10

20

30

40

【0234】

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

【0235】

50

【表7】

表7：25°C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的パラメーター

抗体	捕捉された抗体の量(RU)	100nM結合したヒトC5 R885H-mmh (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

【0236】

10

20

30

40

50

【表 8】

表8：25°CでのヒトC5 R885C-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 抗体の量 (RU)	100nM 結合 したヒトC5 R885C-mmh (RU)	k_a	k_d	K_0	$t_{1/2}$
			(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

【0237】

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。

【0238】

10

20

30

40

50

【表9】

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

抗体	捕捉された 抗体の量 (RU)	100nM ヒトC5 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

【0239】

10

20

30

40

50

【表 10】

表10：37°C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力学的パラメーター

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】

10

20

30

40

50

実施例 4：異なる pH で C5 に結合する抗体

精製された抗 C5 モノクローナル抗体に結合した組み換えヒト C5 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 T200 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 C5 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 (0.01M Na2HPO4 / NaH2PO4、0.15M NaCl, 0.05% 体積 / 体積 Tween-20、pH 7.4 に調整) 及び PBS-T、pH 6.0 (0.01M Na2HPO4 / NaH2PO4、0.15M 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 C5 (EMD、カタログ番号 204888) 又はサル C5-mmh (PBS-T 中で調製、100nM から 11.11nMまでの範囲に及ぶ pH 7.4、3倍希釈) を、抗 C5 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 及び 37 で行った。動力学的解離定数 (kd) を、Scrubber 2.0c 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 (t1/2) を kd から：

【数 1】

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

として計算した。

【0242】

2つのランニングバッファー PBS-T、pH 7.4 及び PBS-T、pH 6.0 中における 25 及び 37 での様々な抗 C5 モノクローナル抗体へのヒト C5 結合についての半減期の比を表 1-1 及び 1-2 に示す。

【0243】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 1 1 : 25°CにおけるヒトC5についての選択された抗C5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

IC=不確定

10

20

30

40

【0244】

50

【表 1 2】

表12：37°CにおけるヒトC5上の選択された抗C5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

IC=不確定

10

20

30

40

【0245】

2つのランニングバッファー PBS-T、pH7.4 及び PBS-T、pH6.0 での 25 及び 37℃における様々な抗C5モノクローナル抗体へのサルC5結合についての半減期の比を表13及び14に示す。

【0246】

50

【表 1 3】

表 1 3 : 25°C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	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

10

20

30

【0 2 4 7】

40

50

【表14】

表14：37°C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	t½ 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

IC=不確定

10

20

30

40

50

【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0.01M HEPES pH7.4、0.15M NaCl、0.05%体積/体積Surfactant Tween-20、0.1mg/mL BSA(Octet HBS-P buffer)中で1000rpm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50μg/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1.5nm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、プロッキングmAbの200μg/mL溶液を含有するウェル中に4分間浸けることにより、プロッキングH4HアイソタイプコントロールmAb(以後プロッキング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50nM hC5

及び第二の抗ヒト C 5 mAb (以後 mAb2 と呼ばれる) 1 μM 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 C 5 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 C 5 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 C 5 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 C 5 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 C D 2 0 抗体を使用して C 5 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 C D 2 0 に対する治療的抗 C D 2 0 抗体は、B 細胞の C D C 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 C D 2 0 を発現する細胞株を使用した C D C アッセイは以前に記載されている (Fleiger et al. 2000, Cell. Immunol. 204 : 55 - 63)。C D 2 0 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 C 5 変異体では C 5 欠乏血清、及び抗 C D 2 0 抗体 (米国特許第 8,529,902 号からの「2F2」の V H / V L を含む抗体) を、C D C における C 5 の役割を評価するために使用した。

【0253】

10

20

30

40

50

C 5 C D C バイオアッセイのために、D a u d i 細胞を 9 6 ウェルアッセイプレート上に 1 0 , 0 0 0 細胞 / ウェルで 1 0 % F B S 、ペニシリン / ストレプトマイシン、L - グルタミン、ピルビン酸ナトリウム及び非必須アミノ酸を含有する R P M I (R P M I 完全培地) 又は 1 % 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 (R P M I / B S A) を含有する R P M I のいずれか中で播種した。変異した抗 h C 5 抗体を試験する全てのアッセイは、C 5 含有ヒト血清を用いる非変異抗体の試験とともに、R P M I 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 C 5 変異体は R P M I / B S A 培地で試験された。ヒト又はサル血清を用いて C D C を測定するために、抗 C D 2 0 抗体を 1 0 0 n M から 2 p M に 1 : 3 希釀し (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 1 0 分間 2 5 °でインキュベートし、続いて 1 . 6 6 % 血清又は 1 . 6 6 % の C 5 欠乏血清及び 6 . 6 n M C 5 変異体タンパク質を加えた。C 5 欠乏血清に加えるべき C 5 タンパク質の量は、ヒト血清中の C 5 濃度の報告された値 0 . 3 7 u M に基づくものであった (R a w a l e t a l 2 0 0 8 、 J . B i o l . C h e m . 2 8 3 : 7 8 5 3 - 7 8 6 3) 。 C D C の C 5 抗体阻害を試験するために、C 5 抗体を 1 0 0 n M から 2 p M に 1 : 3 希釀し (抗体を含有しない対照サンプルを含む) 、そして 1 . 6 6 % 血清又は 1 . 6 6 % の C 5 欠乏血清及び 6 . 6 n M C 5 変異体タンパク質とともに 3 0 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 1 0 分前に、抗 C D 2 0 抗体を細胞に 1 n M 、 2 n M 、 3 n M 、 3 . 5 n M 、 7 n M 、 1 0 n M 、又は 3 0 n M で加えた。抗 C D 2 0 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、 3 7 5 % C O 2 での 3 . 5 時間のインキュベーションの後、 C y t o T o x - G l o T M 試薬 (P r o m e g a 、 番号 G 9 2 9 2) を加えた後に測定した。 C y t o T o x - G l o T M 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、 R L U で測定される) 。対照ウェル中の未処理の細胞を、 C y t o T o x - G l o T M 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 C y t o T o x - G l o T M を加えた 1 5 分後に V i c t o r X 機器 (P e r k i n E l m e r) 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 R L U 値を用いて計算した：

【数2】

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

【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 C D 2 0 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 R L U として表される結果を、 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、 E C 5 0 値及び I C 5 0 値を得た。 0 ~ 1 0 0 % 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 C D 2 0 抗体の濃度から 0 n M 抗 C D 2 0 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 2 5 の抗ヒト C 5 抗体 (1 6 の非変異及び 9 の変異したもの) を、 D a u d i 細胞を使用して抗 C D 2 0 抗体及びヒト血清 (正常 h C 5 又は C 5 変異体を含む) 又はアフリカミドリザル血清を用いた C D C アッセイにおいて C 5 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 の相補性決定領域 (C D R) 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 H 4 H 1 2 1 6 6 P 2 ~ H 4 H 1 2 1 6 6 P 1 0 を生成

10

20

30

40

50

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: Daubedi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 ミドリザル	C5欠乏ヒト 及び6.6nM C5 変異体 R885H	C5欠乏ヒト及び 6.6nM C5 変異体 R885C
抗CD20抗体の EC50 [M] (1.66% 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 (1.66%血清を 用いる)	1nM		3nM	3.5nM	30nM
抗体	IC50 [M]		IC50 [M] (最大阻害%)*	IC50 [M]	IC50 [M] (最大 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mAb1	阻害無し	阻害無し	未試験	未試験	未試験
対照mAb2	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

10

20

30

40

50

害を生じた。

【0258】

【表17】

表17 : Daudi細胞において1. 66%血清及び抗CD20抗体を用いたCDCの変異抗hC5抗体阻害

血清	ヒト	アフリカ ミドリザル	C5欠乏ヒト及び 6.6nM C5変異体 R885H	C5欠乏ヒト及び6.6nM C5変異体 R885C
抗CD20抗体の EC50 [M] (1.66% 血清を用いる)	1.9E-09	2.6E-09	6.3E-09	9.5E-09
一定抗CD20抗体 (1.66%血清を 用いる)	2nM	10nM	7nM	30nM
抗体	IC50 [M]	IC50 [M] (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

*別に示されていなければ、全ての阻害は約100%である。

【0259】

16の非変異抗hC5抗体は、2.0nM~14nMの範囲に及ぶIC50でアフリカミドリザルC5により媒介されるCDCの完全阻害を示した。

【0260】

9つの変異抗体のうち4つは、7.1nM~9.9nMの範囲に及ぶIC50でアフリカミドリザルC5により媒介されるCDCの完全阻害を示した。残りの6つの変異抗体は、10nMより大きいIC50での遮断薬であり、そして最大阻害(100nM抗体で)は34%~85%の範囲に及んだ。親非変異抗体H4H12166Pは4.5nM及び5.6nMのIC50で完全阻害を生じた。

【0261】

抗hC5抗体がヒトC5変異体、R885H及びR885Cを阻害するかどうかを試験するために、C5欠乏ヒト血清を各C5変異体6.6nMを用いて試験した。全25の抗hC5抗体は、0.48nM~4.2nMの範囲に及ぶ非変異抗体のIC50でC5変異体

10

20

30

40

50

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 (Monk et al . 2 0 0 7 、 Br . J . Pharmacol . 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) を用いてリストフェラーゼ受容体 [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 と共に PLC - 活性化及びその後の C a + + 上昇をもたらし得、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 et al . 2 0 0 5 、 Trends Pharmacol . Sci . 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 - 1 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 / mL G 4 1 8 、 1 0 0 μ g / mL ハイグロマイシン B 、及び 7 μ g / mL ブラストサイジンを含有する 1 0 % D M E M 中で維持した。

20

【 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 - 1 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 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 et al . 、 2 0 1 3 、 Pharmacol . Rev . 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 ℃ 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 (Promega 、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

30

40

50

エラーを産生及び発光をもたらす（相対的光単位 R L U で測定して）。発光の測定を V i c t o r X 機器 (Perkin Elmer) を使用して行った。Prism 5 ソフトウェア (GraphPad) 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 EC₅₀ 値及び IC₅₀ 値を得た。0 ~ 100 % 阻害が阻害剤のない 500 pM hC5a から 0 nM 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 500 pM 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
500 pM hC5a の抗 hC5 抗体阻害

EC ₅₀ [M] hC5a	3.9E-10
mAb PID 又は識別番号	500 pM hC5a の阻害
	IC ₅₀ [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、0.035 nM ~ 0.46 nM の範囲に及ぶ IC₅₀ で 500 pM hC5a の完全阻害を示した。関連のない IgG 対照抗体、対照 mAb 3 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 EC₅₀ 0.39 nM 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 (S R B C) を G V B + + 緩衝液で洗浄し、そして 1×10^8 細胞 / m L で再懸濁させた。S R B C を感作するために、等体積の 1 : 50 希釀されたウサギ抗ヒツジ溶血素 (1.5 mg / m L) と 37 度で 20 分間混合した。感作された S R B C 細胞を、溶血アッセイにおいて使用する前に G V B + + 中で 2×10^8 細胞 / m L に希釀した。正常ヒト血清又はカニクイザル血清を 2 % 又は 10 % に G V B + + 緩衝液で希釀した。C 5 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 度でプレインキュベートした。丸底 96 ウェルプレートを溶血活性を測定するために使用した。合計で 100 uL の感作されたヒツジ R B C (2×10^8 細胞 / m L) を 96 ウェルプレートにプレーティングし、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 uL を加えた。細胞を穩やかに混合し、そして 37 度で 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 度で 1250 × g での遠心分離により沈降させた。合計 100 uL 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 】

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

10

20

【 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 G V B + + 緩衝液のみでインキュベートされた細胞からの A 412 nm の OD である。「最大細胞溶解」は、水で処理された細胞からの A 412 nm の OD である。溶血 % で表される結果を 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、IC 50 値を得た。データは平均 ± 平均の標準誤差として表される。

30

【 0274 】

(B) 代替補体アッセイ

所望の数のウサギ赤血球 (R b R B C) を G V B - Mg²⁺ / E G T A 緩衝液で洗浄し、そして 2×10^8 細胞 / m L で再懸濁させた。正常ヒト又はカニクイザル血清を G V B - Mg²⁺ / E G T A 緩衝液中 10 % に希釀した。C 5 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 度で 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 uL の R b R B C (2×10^8 細胞 / m L) を 96 ウェルプレートにプレーティングし、続いて抗 C 5 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 uL を加えた。細胞を穩やかに混合し、そして 37 度で 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 × g で 4 度にて遠心分離することにより沈降させた。合計で 100 uL 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。

40

【 0275 】

溶血パーセントを以下のように計算した：

【 数 4 】

50

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

【0276】

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C5抗体も用いないGVB-Mg / EGT A緩衝液のみでインキュベートされた細胞からのA412nm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A412nmでのODである。抗C5抗体による阻害、IC₅₀値を、Prism 6ソフトウェア(Graph Pad)を用いて非線形回帰(4パラメータロジスティクス)を使用して計算した。

10

【0277】

結果

(A) ヒトC5溶血の阻害

合計25の抗ヒトC5(hC5)抗体(16の非変異及び9つの変異)を、CH50アッセイにおいて感作されたヒツジ赤血球(SRBC)を使用して、及びウサギ赤血球(RRBC)を使用してAH50アッセイにおいて正常ヒト血清(NHS)からのC5を阻害するそれらの能力について試験した。

20

【0278】

【表19】

表19：1%又は5%正常ヒト血清(NHS)におけるCP及びAP活性の抗hC5抗体阻害

mAb PID	ヒトCP	ヒトAP	ヒトCP	ヒトAP
	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [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

30

40

50

【0279】

表19に示されるように、本発明の16の抗hC5抗体は、ヒト血清の1%で存在するC5により媒介される古典的経路(CP)において溶血の94%より多い阻害を示した。抗体のIC50は2.1~5.9nMの範囲に及び、そして阻害パーセントは95%~99%の範囲に及んだ。全16の抗C5抗体は、5%NHS中に存在するC5により媒介される代替経路(AP)溶血アッセイにおいて60%より多い阻害(H4H12169Pを除く)を示した。抗体のIC50は13~160nMの範囲に及び、そして阻害活性パーセントは44%~81%の範囲に及んだ。

【0280】

【表20】

10

表20：5%正常ヒト血清(NHS)におけるCP及びAPの抗hC5抗体阻害

mAb PID	ヒトCP	ヒトAP	ヒトCP	ヒトAP
	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [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
アイソタイプコントロール	活性なし	活性なし	活性なし	活性なし

20

30

【0281】

表20に示されるように、9つの変異した抗hC5抗体は全て、5%ヒト血清中に存在するC5により媒介されるCP及びAP溶血活性の阻害を示した。CP溶血アッセイにおいて、親非変異抗体H4H12166Pは、10.9nMのIC50で98%より高い阻害を示した。8つの変異抗hC5抗体は、10.3nM~24.3nMの範囲に及ぶIC50で90%より高い阻害を示した。変異体抗C5抗体12166P10は74%の部分阻害を示した。AP溶血アッセイにおいて、親非変異抗体H4H12166Pは、20.9nMのIC50で85%より高い阻害を示した。変異抗hC5抗体は72~83%の阻害範囲を示し、IC50抗体は28nM~0.15μMの範囲に及んだ。

40

【0282】

(B) サルC5溶血の阻害

合計25の抗ヒトC5(hC5)抗体(16の非変異及び9つの変異)を、感作ヒツジ赤血球(SRBC)を使用するCH50アッセイ及びウサギ赤血球(RRBC)を使用するAH50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C5を阻害するそれらの能力について試験した。

【0283】

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 CP 及び AP 活性の
抗 h C 5 抗体阻害

	AGM 血清 CP	AGM 血清 AP	AGM CP	AGM AP
mAb PID	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [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%

10

20

30

【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 CP 又は AP 溶血活性の阻害を示した。CP 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 nM ~ 180 nM の範囲に及ぶ IC₅₀ で 43 ~ 94 % の範囲に及ぶ阻害を示した。AP 溶血アッセイにおいて、17 の抗体のうち 13 は、22.5 nM ~ 233 nM の範囲に及ぶ IC₅₀ で 17 % ~ 93 % の範囲に及ぶ阻害活性を示した。

【0 2 8 5】

40

50

【表 2 2】

表 2 2 : 5 % 正常カニクイザル (Cyno) 血清における CP 及び AP 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 ₅₀ [M]	IC ₅₀ [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 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

【0286】

表 2 2 に示されるように、抗 h C 5 抗体 (64 % CP 阻害を示した H4H12183P2 を除く) は、5 % カニクイザル血清において CP 又は AP 溶血アッセイの 90 % より高い阻害を示した。CP 溶血アッセイにおいて、抗体の IC₅₀ は 7.15 nM ~ 142 nM の範囲に及んだ。AP 溶血アッセイにおいて、抗体の IC₅₀ は 5.4 ~ 29.6 nM の範囲に及んだ。

【0287】

(C) 変異体ヒト C 5 溶血の阻害

選択された抗 C 5 抗体を、CH50 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 885H を追加した C 5 欠乏ヒト血清において、H4H12166P、及び対照薬 2 は、それぞれ 6.0 nM 及び 4.4 nM の IC₅₀ 値、並びにそれぞれ 7.6 nM 及び 5.5 nM の IC₈₀ 値で CP 溶血を遮断した。変異体 R 885C について、H4H12166P 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 CP 溶血を、それぞれ 9.3 nM 及び 6.8 nM の IC₅₀ 値、並びにそれぞれ 11 nM 及び 8.2 nM の IC₈₀ 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。

【0288】

40

50

(D) ヒトC5b-6複合体の阻害

選択された抗C5抗体を、CH50アッセイにおいてC5欠乏ヒト血清からのヒトC5b-6複合体を阻害するそれらの能力について試験した。H4H12166Pは、外来性huc5b-6複合体を追加したC5欠乏ヒト血清中でCP溶血を3.8nMのIC50値及び5.8nMのIC80値で強く遮断した。対照的に、対照薬1はC5b-6複合体媒介溶血をより低い効力で、それぞれ5.0nMのIC50値及び4.6nMのIC80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70%が阻害しなかった。対照薬2はヒトC5b-6複合体溶血活性を遮断しなかった。

【0289】

実施例9：抗C5抗体はCP溶血アッセイにおいてC5aの生成を遮断する

10

抗C5抗体がC5a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(CP)溶血についてのアッセイからの上清をELISAによりC5aレベルについて分析した。

【0290】

C5切断の結果として生成されたC5aは74アミノ酸のタンパク質フラグメントである。C5a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73アミノ酸形態、C5a_{des}-Argとなる。従ってC5a_{des}-Argの定量は、インビポ及びインビトロでのC5a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MicroVue C5a ELISAキットは、製造者により提供される情報に従ってC5a_{des}-Argを検出する。予備実験(データは示していない)は、C5aの一次74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「C5a」と呼ばれる。

20

【0291】

C5aタンパク質レベルを、CP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H4H12166P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(NHS)を使用して決定した。C5aタンパク質レベルを、MicroVue C5a ELISA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C5a上の新エピトープ(neo-epitope)に特異的なマウス抗C5a)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C5aタンパク質を、較正のための標準として使用した。上清中のC5aを、HRP結合検出抗体(C5のC5a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HRP-基質、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)を、HRP活性を検出するために加えた。1N塩酸溶液を使用して反応を停止させ、そして450nmでの光学密度(OD450)をSpectraMaxプレートリーダーで測定した。GraphPad Prismにおいて非線形回帰(4パラメータロジスティクス)を使用してデータを分析した。C5a濃度はng/上清mLとして解析した。

30

【0292】

5% NHSを使用したアッセイにおいて、H4H12166PはC5aタンパク質レベルの増加を用量依存性の様式で8.5nMのIC50で強く遮断したが、アイソタイプコントロール抗体はC5aレベルに対して影響を有していないかった(図1)。最も高い試験されたH4H12166P濃度(267nM)での最大遮断は、5%血清において最も低い試験されたH4H12166P濃度(1nM)で観察された34ng/mL(2.8nM)と比較して、3.8ng/mL(0.3nM)へのC5aヘレベルの約10倍の減少を生じた。最大遮断について観察されたC5a濃度は、未処理の5%NHSにおける2.3ng/mL(0.2nM)のベースラインC5aレベルに近かった。

40

【0293】

実施例10：カニクイザルにおける抗C5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C5抗体の薬物動態(PK)及び薬力学(PD)の特徴づけを記載する。内因性C5レベルを、抗C5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 $0.85\text{ }\mu\text{g/mL} \pm 19.17\text{ }\mu\text{g/mL}$ 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 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。

10

【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/IgG4Fc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IgG4Fc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(LLQ)はこのアッセイ(2%サル血清)において 1.56 ng/mL であり、そしてそのままのサル血清では 78 ng/mL であった。

20

【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ボー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。

30

【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(Cmax)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、tmax、及び観察された推定半減期(T1/2)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(AUClast)及び時間ゼロから無限大まで推定したもの(AUCinf)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。

40

【0300】

古典的経路溶血アッセイ：ヒツジ赤血球(SRBC)をGVB++緩衝液(CaCl2及びMgCl2を含むゼラチン・ベロナール緩衝液)(Boston Bioprotects)で洗浄し、そして 1×10^9 細胞/mLで再懸濁させた。SRBCを感作するために、合計 1×10^9 /mLのSRBCを等体積の1:50希釈ウサギ抗ヒツジ溶血素(1.5 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 2×10^8 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750

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 GVB++緩衝液で 10% に希釈した。丸底 96 ウエルプレートを溶血活性を測定するために使用した。合計 100 μl の感作 S R B C (2 × 10^8 細胞 / mL) を 96 ウエルプレートに 37℃ でプレーティングし、続いてそれぞれの時点からの 10% カニクイザル血清 100 μl を加えた。S R B C を穏やかに混合し、そして 37℃ で 10 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 1250 × g、4℃ で遠心分離した。合計 100 μL 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にて 412 nm 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：

【数 5】

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

【0301】

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 S R B C からの A 412 nm での OD 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 412 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。

【0302】

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 GVB-Mg2+/EGTA 緩衝液で洗浄し、そして 2 × 10^8 細胞 / mL で再懸濁させた。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、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 96 ウエルプレートを溶血活性を測定するために使用した。合計 100 μl の R b R B C (2 × 10^8 細胞 / mL) を 96 ウエルプレートに 37℃ 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 10% カニクイザル血清 100 μl を加えた。R b R B C 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の後に、細胞を 1250 × g、4℃ で遠心分離した。合計 100 μL 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にて 412 nm 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 RBC 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。

【0303】

結果

選択された抗 C5 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 C5 ヒト化マウスにおける延長された薬物動態プロフィールについて試験した（実施例 10 に記載される）。H4H12166P 及び H4H12161P を、延長された PK と共に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。

【0304】

カニクイザルに H4H12166P、H4H12161P、又は対照薬 2 の単回 15 mg / kg IV 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 (CP) 溶血活性パーセントを、70 日生存期間の間に 19 の時点で決定した。代替経路 (AP) 溶血を、50 日生存期間の間に 17 の時点で決定した。表 2 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ィールを図 2 に示す。平均 PK パラメータ

10

20

30

40

50

ーを表24に記載する。

【0305】

【表23】

表23：選択された抗C5抗体の雄性カニクイザルへの単回15mg/kg静脈内注射後の血清中の総IgGの平均濃度

時間 (投薬後時間)	数	Abの血清濃度 (μg/mL)		
		平均±SD	H4H12166P	H4H12161P
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

【0306】

I.Vボーラス投与後に、H4H12166P、H4H12161P、及び対照薬2の総IgG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、続いて单一排出相により特徴づけした。ピークH4H12166P、H4H12161P、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_{max}/用量値は1.1倍以内であった（それぞれ29.7、30.4、及び30.6 [(ug/mL) / (mg/kg)] ）（表24）。

【0307】

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 15 mg/kg 静脈内注射後の
血清中の総 IgG 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	
	15 mg/kg IV (n=4)					
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
C_{\max} ($\mu \text{g/mL}$)	445	30.0	456	26.2	459	55.2
$C_{\max}/\text{用量}$ ($\mu \text{g/mL}$) / (mg/kg)	29.7	2.00	30.4	1.75	30.6	3.68
C_0 ($\mu \text{g/mL}$)	448	30.5	458	26.6	461	55.6
t_{\max} (時間)	0.083	0	0.083	0	0.083	0
AUC_{last} 日・($\mu \text{g/mL}$)	5080	1040	2350	357	2810	470
$AUC_{\text{last}}/\text{用量}$ 日・($\mu \text{g/mL}$) / (mg/kg)	339	69.3	157	23.8	187	31.3
AUC_{inf} 日・($\mu \text{g/mL}$)	5550	671	2350	356	2810	470
$AUC_{\text{inf}}/\text{用量}$ 日・($\mu \text{g/mL}$) / (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_{ss} (mL/kg)	60.4	4.85	44.0	4.34	45.3	3.06
$t_{1/2}$ (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。

【0308】

濃度 - 時間プロフィールの評価は、研究 71 日目まで終末抗体濃度 $10 \mu \text{g/mL}$ で最も遅い排出を示すことを明らかにした。H4H12161P 及び対照薬 2 の動力学は似ていた；両方とも Mab 濃度 $10 \mu \text{g/mL}$ でそれぞれ 22 日及び 29 日目まで H4H12166P より早い排出を示した。

【0309】

結果として、用量正規化曝露 ($AUC_{\text{last}}/\text{用量}$) は、H4H12166P が 339 日 * ($\mu \text{g/mL}$) / (mg/kg) で最も高い曝露を有していたが、H4H12161P 及び対照薬 2 は H4H12166P よりも約 2 倍低い曝露、それぞれ 157 及び 187 日 * ($\mu \text{g/mL}$) / (mg/kg) を有していた。

【0310】

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 ~ 15.6 日の範囲に及び、そしてまた H4H12166P が対応する最も高い $t_{1/2}$ 15.6 日を有する一方で H4H12161P 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、曝露と相關していた。

【0311】

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 (SRBC) の補体古典的経路 (CP) 溶血及びウサギ赤血球 (RbRBC) の代替経路 (AP) 溶

10

20

30

40

50

血によりエクスピボで決定した。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 RBC の総溶血のパーセンテージとして表した。表 25 は、平均溶血パーセントにより決定された 3 つの抗体のエクスピボ活性を要約する。

【0312】

【表 25】

表 25：選択された抗 C5 抗体のエクスピボ古典的及び代替経路溶血パーセント活性

時間 (投与後 の時間)	数	カニクイザル血清における古典的経路			カニクイザル血清における代替経路溶血%		
		溶血%、10 分、平均±SEM			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； B L Q=定量下限未満；

NC=計算していない

【0313】

表 25 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。

【0314】

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 25 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。H4H12166P 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。

10

20

30

40

50

【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C5ELISA(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1μg/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較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(AUClast)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(CaCl₂及びMgCl₂を含むゼラチンベロナール緩衝液)(Boston Bioproducts)で洗浄し、そして 1×10^9 細胞/mLで再懸濁させた。感作するために、 1×10^9 /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(1.5mg/mL)と37℃で20分間混合した。感作したSRBCを 2×10^8 細胞/mLにGVB++中に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 $100\mu l$ (2×10^8 細胞/mL)を96ウェル丸底プレート中に37℃でブレーティングし、続いて $160 \sim 180\mu g/mL$ ヒト補体3(huC3)タンパク質を追加された20%血清 $100\mu l$ を加えた。細胞を穏やかに混合し、そして37℃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 $1250 \times g$ で4にて遠心分離した。上清合計 $100\mu L$ 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

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(GraphPad)を用いて非線形回帰(4パラメータロジスティクス)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 E L I S A (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 μg/mL ± 17.82 μg/mLと決定した。雄性(55.4 ± 1.7 μg/mL、n = 47)マウスと雌性(24.7 ± 0.6 μg/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 μg/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15mg/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樂死させ、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

50

【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 mg / kg 皮下注射後の血清中の総 Ig G の平均濃度

時間 (日)	数	Ab 血清濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
		平均 \pm SD	H4H12166P	対照薬 1	対照薬 2
1	22	178 \pm 22.7	229 \pm 40.7	164 \pm 24.1	
10	4	83.7 \pm 22.2	102 \pm 22.9	44 \pm 24.1	
20	5	57.1 \pm 26.8	29 \pm 31.3	11.4 \pm 10.3	
30	5	38.1 \pm 7.6	30.1 \pm 34.2	3.6 \pm 3.2	
40	4	11.9 \pm 5.0	0.4 \pm 0.4	0.5 \pm 0.4	
50	4*	9.3 \pm 12.2	0.3 \pm 0.3	0.3 \pm 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つたため。

10

20

【0325】

【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	$\mu\text{g}/\text{mL}$	178	229	164
AUC _{last}	日 \cdot $\mu\text{g}/\text{mL}$	2801	2708	1418
t _{1/2}	日	11.3	4.7	7.6

30

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点まで計算された AUC ; T_{1/2} = 観察された推定半減期

【0326】

1 日目の平均濃度対時間プロフィールは、3 つの抗体、H4H12166P、対照薬 1 及び対照薬 2 がそれぞれ 178、229 及び 164 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 H4H12166P 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、H4H12166P に対してクリアランスの急速な増加を示した。50 日目に、H4H12166P は約 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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、H4H12166P (2801 日 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及び対照薬 1 (2708 日 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と比較して約 2 倍低い AUC_{last} (1408 日 $\mu\text{g}/\text{mL}$) であった。

40

【0327】

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 H4H12166P、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) 溶血によりエクスピボで決定した。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。

【0328】

50

【表 28】

表 28 : 抗ヒト C5 抗体のエク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、技術的問題のために 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關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 C5 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 C5 マウス (ヒト C5 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 C5 レベルを、製造者の推奨に従って行われたヒト補体 C5 E L I S A (A b c a m、カタログ番号 a b 1 2 5 9 6 3) を使用して決定した。マウスにおけるヒト C5 の平均濃度は、48.98 μg / mL ± 15.1 μg / mL と決定された。

【0331】

抗体投薬の前に、ヒト化雄性及び雌性 C5 マウスを、ヒト C5 レベルに従って階層化し、これは平均 50 μg / mL であった。各抗 C5 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 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°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 C5 抗体についての総血清抗体濃度を表 29 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 30 に記載する。

【0333】

10

20

30

40

50

【表 2 9】

表29：ヒト化C5マウスにおける選択された抗C5抗体の単回15mg/kg皮下注射後の
血清中の総IgG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。

【0334】

【表30】

表30：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。

【0335】

平均濃度対時間プロフィールは、H4H12166P、H4H12161P、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(178、225、183及び221)μg/mLで1~3日目に最大血清濃度(C_{max})に達したことを示す。H4H12166P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59日目に約4μg/mLであった。H4H12161PはH4H12166P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。59日目に、H4H12161Pは平均血清薬物レベル0.6μg/mLを有していたが、対照薬1は0.08μg/mLというほぼ検

10

20

30

40

50

出不可能な薬物レベルであった。

【 0 3 3 6 】

アイソタイプコントロール、H 4 H 1 2 1 6 6 P 及び H 4 H 1 2 1 6 1 P は、1.3 倍以内の同様の曝露 (A U C _{1 a s t}) 値 (それぞれ 4 0 8 0, 3 4 9 0 及び 3 0 4 0 日 μ g / mL) を示したが、対照薬 1 は、H 4 H 1 2 1 6 6 P と比較して 1.6 倍低い曝露 (2 2 4 0 日 μ g / mL) を示した。

【 0 3 3 7 】

実施例 12：総ヒト C 5 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 C 5 の血清濃度を、抗 C 5 抗体 H 4 H 1 2 1 6 6 P 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

【 0 3 3 8 】

総ヒト C 5 の血清濃度を、C 5 の代理として C 5 配列に含有される 10 アミノ酸ペプチド L Q G T L P V E A R (配列番号 3 5 9 のアミノ酸 (aa) 1 1 2 9 ~ 1 1 3 8) 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 C 5 分裂産物 C 5 b も検出し得る。しかし、遊離 C 5 b の不安定性のために、血清中の C 5 b の濃度は一般的に低く、C 5 b 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; Hadde 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 C 5 b 生成物だけ含有する可能性がある。 20

【 0 3 3 9 】

方法

PK / PD 研究のために、マウスに H 4 H 1 2 1 6 6 P の単回 1 5 mg / 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 1 0, 2 0, 3 0, 4 0, 5 0 及び 6 0 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。

【 0 3 4 0 】

ヒト C 5 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 C 5 ペプチドを内部標準として使用した (L Q G T L P V E A R - 1 3 C 6 1 5 N 4)。マウス C 5 遺伝子が削除されている (C 5 - / -) 社内で生成された C 5 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 ~ 2 5 0 μ g / mL (1 : 2 段階希釈) の範囲に及ぶ濃度で使用した。C 5 - / - マウスからの血清をネガティブコントロール (プランク) としても使用した。較正標準、プランク、及び試験血清サンプル (それぞれ 1 0 μ L) を乾燥させ、ついで 8 M 尿素 / 2 0 mM Tris (2 - カルボキシエチル) ホスフィン (T C E P) 緩衝液 1 0 0 μ L 中 3 7 で 1 時間変性させた。次に、2 5 nM 内部標準 1 0 μ 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 1 0 mM で室温にて 3 0 分間アルキル化し、そして 5 0 mM 炭酸水素アンモニウムを使用して最終体積 5 0 0 μ L に希釈した。ついでサンプルをトリプシン (1 : 2 0 質量 / 質量) により終夜 3 7 で消化した。C 5 由来のトリプシンペプチド L Q G T L P V E A R を検出し、そして Waters Xevo TQ - S を A C Q U I T Y 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 (1 0 μ L) を予め平衡化された A C Q U I T Y UPLC B E H C 1 8 カラムに注入した。流量は 0.6 mL / 分であった (移動相 A : 水 : ギ酸 / 1 0 0 : 0.1 [体積 : 体積] 及び移動相 B : アセトニトリル : ギ酸 / 1 0 0 : 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 C 5 ペプチド) に対する C 5 参照標準 (h C 5 のトリプシン消化により生成された未標識 C 5 ペプチド L Q G T L P V E A R - 1 2 C 6 1 4 N 4) のピーク面積比を、C 5 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 C 5 検体の濃度を計算した。濃度を線形回帰を使用し 40

て計算した。C 5 参照標準の最も低い濃度 (3.9 μg / 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 C 5 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 h C 5 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。C 5 / H4H12166P モル比の分析は、H4H12166P が投薬後 35 日目まで C 5 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 日数	CP 溶血% 平均±SD	阻害%	C5 (μg/mL)			H4H12166P (μg/mL) 平均±SD	モル比 終末 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 力値 > 1000 のために除外された						
60	73.57	5	n/d			5.9	n/d

^a 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。^b 倍数変化 = 終末（示された投薬後の日）C 5 : 投薬前 C 5。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 × 30 日目、1 × 35 日目、2 × 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 C 5 への H4H12166P 結合のエピトープマッピング

H4H12166P が相互作用する h C 5 [（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 Acuity 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 Acuity M-クラス（μBinary 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

10

20

30

40

50

った。

【0345】

標識化溶液をD₂O中10 mM PBS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 D₂O標識化溶液と様々な時点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 × 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 × 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37V、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/MS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/MS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 重心 H ⁺	C5+H4H12166P 重心 MH ⁺	Δ	C5 重心 MH ⁺	C5+H4H12166P 重心 MH ⁺	Δ
591-599	1015.38±0.09	1014.44±0.16	-0.93	1015.64±0.04	1014.60±0.08	-1.04
593-599	769.41±0.11	768.33±0.05	-1.08	769.65±0.01	768.30±0.004	-1.35
775-787	1693.81±0.11	1692.85±0.07	-0.96	1694.06±0.04	1692.96±0.02	-1.10
775-794	2439.62±0.29	2438.42±0.20	-1.20	2440.16±0.06	2439.17±0.21	-0.99
779-787	1141.14±0.04	1140.21±0.05	-0.93	1141.23±0.03	1140.21±0.02	-1.02

【0349】

記録されたペプチド質量は、3つの複製からの重心MH⁺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、H4H12166P40

10

20

30

40

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) HR 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樂死させた。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。

10

【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）。

20

【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ということを示唆する。

30

【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、Velocigene (R) 技術 (Valenzuela et al 2003, Nat. Biotech nol. 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

40

50

された。ヒト化マウスを、マウスC5遺伝子のエクソン2～エクソン41をヒトC5遺伝子のエクソン2～42で置き換えるように操作した（米国特許出願公開第2015/0313194号（その全体として本明細書に加入される）に開示される）。

【0355】

方法

成体雄性マウスを、マイコバクテリウム・ツベルクローザス (*Mycobacterium tuberculosis*) 株H37RAを2.5mg/mlまで追加したCFAの0.2mlエマルションでヒト光受容体間レチノイド結合タンパク質 (IRBP) ベブチド1～20 (GPTHLFQPSLVLDMAKVLLD) (配列番号364) (Avichezer et al 2000, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41: 127-131) 150μgを皮下で免疫した。次いで、免疫応答のTh1活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 (PTX) 1.0μgをマウスに腹腔内接種した (Thurau 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。

10

【0356】

眼の試験を - 1日目、EAU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 (120mg/kg、IP) 及びキシラジン (5mg/kg、IP) 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 Spectralis Heidelberg 網膜血管造影プラットフォーム (HRA) + OCTシステム (Heidelberg Engineering, Carlsbad, CA, USA) において試験した。

20

【0357】

Spectralis HRA + OCTシステム (Heidelberg Engineering, Carlsbad, CA, USA))でOCT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。OCT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RPE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1500μm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。

30

【0358】

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OCT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OCT画像において等級付した。

【0359】

OCT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 (OCTスコア) (表33)。

【0360】

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
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 μm)
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 μm)；微量の網膜剥離
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 μm喪失又は>40 μm增加)；大きな網膜剥離

【0361】

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GraphPad Prismバージョン5.0d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±SEMを示す。0.05未満のp値を統計的に有意とみなした。

【0362】

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）。

【0363】

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】

10

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学的証拠を提供する。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】

20

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分間両側腎茎をクランプし、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】

30

【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、% 变化 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

40

【0368】

50

【表 3 5】

表 3 5：予防的及び治療的様式で抗 C 5 抗体 (M1M17628N) 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

【0369】

野生型マウスと比較して、C3及びC5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RIRIモデルにおいて有意な機能的保護を示した。抗C5抗体は、予防的及び治療的の両方の様式でRIRIモデルにおいて機能的保護を示した(表34～35)。

【0370】

20

実施例17：ループス腎炎に対する抗C5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C5抗体の有効性を記載する。

【0371】

全身性エリテマトーデス(SLE)は、自己抗原に対する忍容性の喪失、自己抗体の產生及び損傷組織における補体結合免疫複合体(IIC)の沈着により引き起こされる自己免疫障害である。SLE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C5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NZBWF1マウスにおいて調べた(Yang et al. 1996, PNAS)。マウスは、ヒトSLE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35～50週齢で腎不全及び終末期腎疾患で死亡する。

30

【0372】

この試験のために、25週齢NZBWF1マウスを、30mg/kgのアイソタイプコントロール、又は抗C5抗体で週に2回8週間、続いて週に3回10週間皮下処置した。この試験のために使用した抗マウスC5抗体は、それぞれ配列番号362/363及び365/366のHCVR/LCVRを含むM1M17628N及びM1M17627Nであった。

40

【0373】

抗C5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13)。両方の抗体が、処置の8～14週目にアルブミン尿(図14)、及び処置の12～16週目に血中尿素窒素(図15)を改善した。

【0374】

実施例18：星状細胞細胞死に対する抗C5抗体の効果

視神経脊髄炎(NMO)は、主に視神経及び脊髄に影響を及ぼす中枢神経系(CNS)の自己免疫疾患である。NMOにおいて、抗アクアポリン4自己抗体(AQP4-Ab)は補体依存性細胞傷害(CDC)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、NMO進行における補体系の役割、及びNMO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大脳皮質から得て、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-GloTM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、10
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。

【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-GloTM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15～17nM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糸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るべきである。ここでは、不死化ヒト糸球体内皮細胞株（HGE）を使用して、補体C3及びC5沈着モデルを抗C3又はC5mAbの遮断活性を評価する使用について実証した。

【0381】

方法

ヒト初代腎臓糸球体内皮細胞（HGE；Cell Biologicals）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ツ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で観察された

10

20

30

40

50

が、非活性化 H G E C では観察されなかった (C 3 : $1.5 \times 10^7 \pm 1.0 \times 10^7$; C 5 : $7.9 \times 10^6 \pm 6.6 \times 10^6$, P < 0 . 0 5 対非 A D P 活性化 H G E C) 。 C 3 及び C 5 b - 9 の沈着は C 3 又は C 5 欠乏血清に曝露された A D P 活性化 H G E C において有意に減少された (C 3 : $3.3 \times 10^5 \pm 4.8 \times 10^4$; C 5 : $1.5 \times 10^6 \pm 6.0 \times 10^5$, P < 0 . 0 5) 。遮断抗 C 5 m A b を加えることにより、A D P 活性化 H G E C 上への正常ヒト血清由来 C 5 b - 9 沈着を有意に減少し、沈着は C 5 欠乏血清と同様であった (C 5 m A b : $1.02 \times 10^6 \pm 6.0 \times 10^5$, 対照 m A b : $3.7 \times 10^6 \pm 1.6 \times 10^6$, P < 0 . 0 5 対対照 m A b) 。

【 0 3 8 3 】

結論

これらのデータは、補体 C 3 及び C 5 沈着のモデルを作るためのインビトロヒト糸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。

【 0 3 8 4 】

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

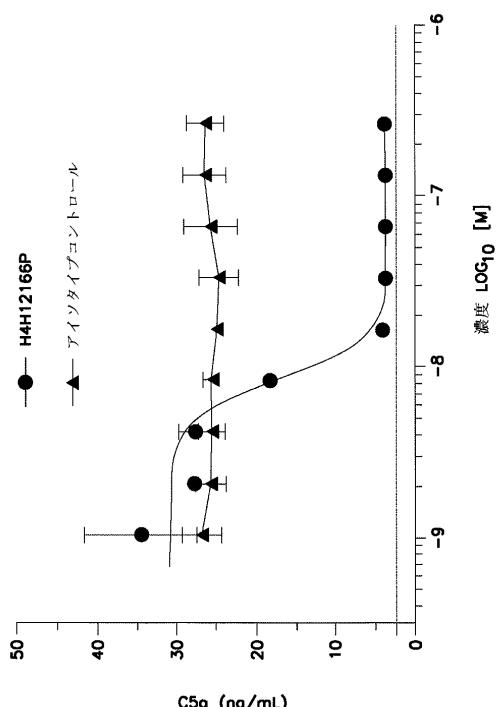
30

40

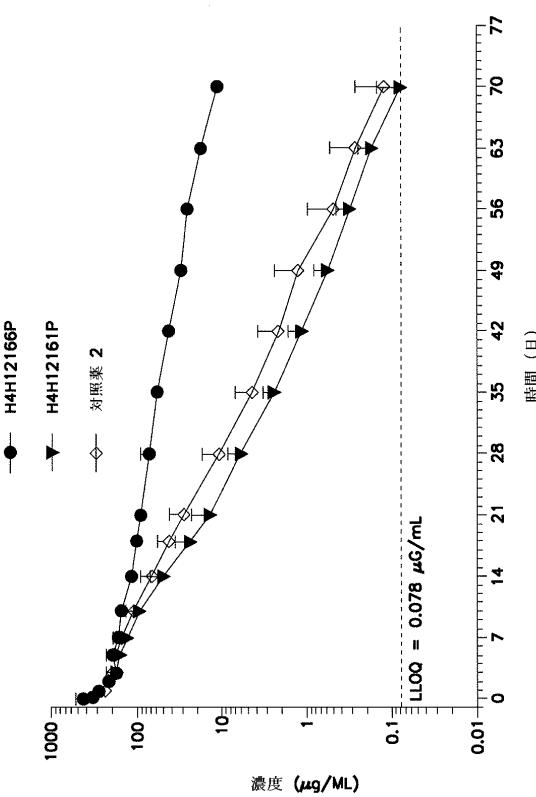
50

【図面】

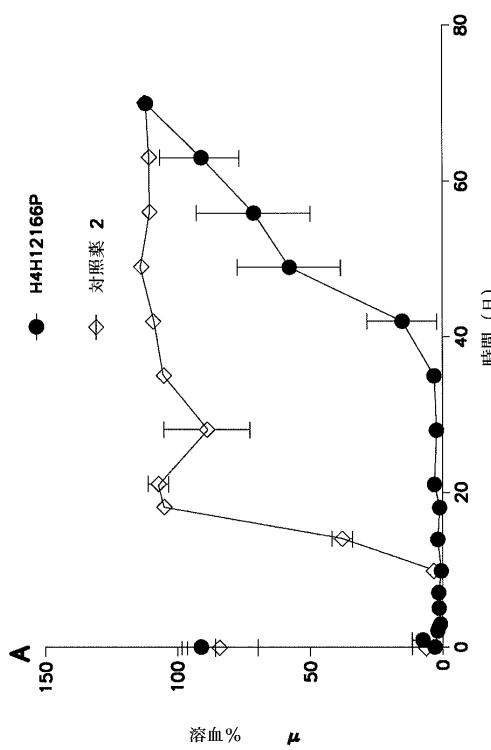
【図 1】



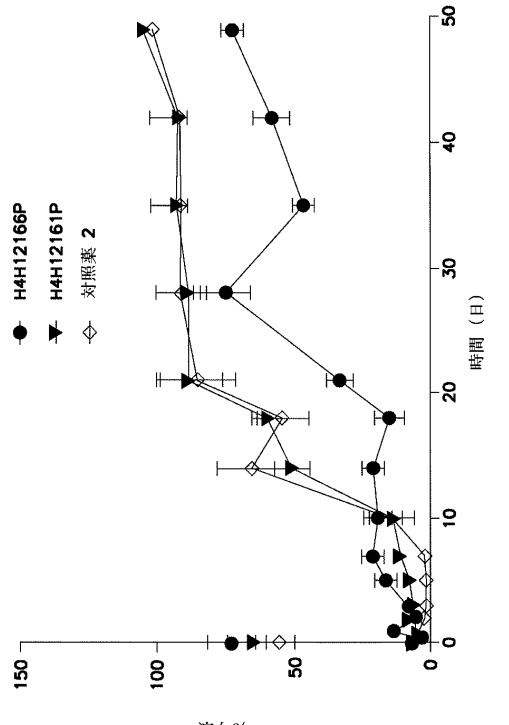
【図 2】



【図 3 A】



【図 3 B】



10

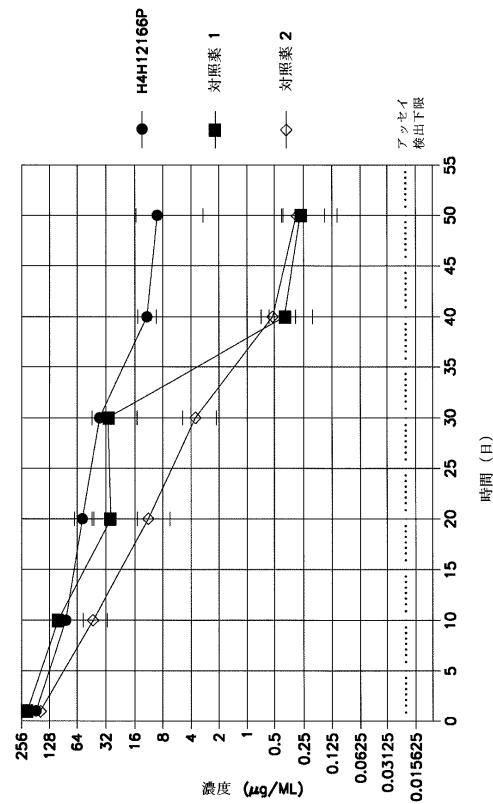
20

30

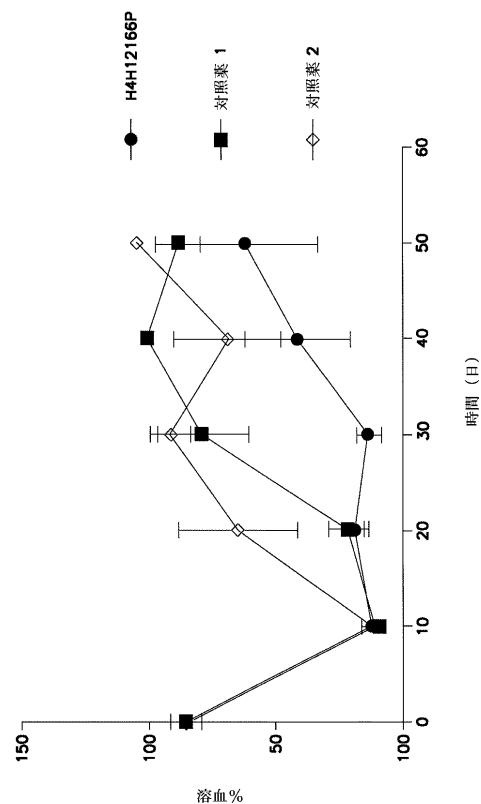
40

50

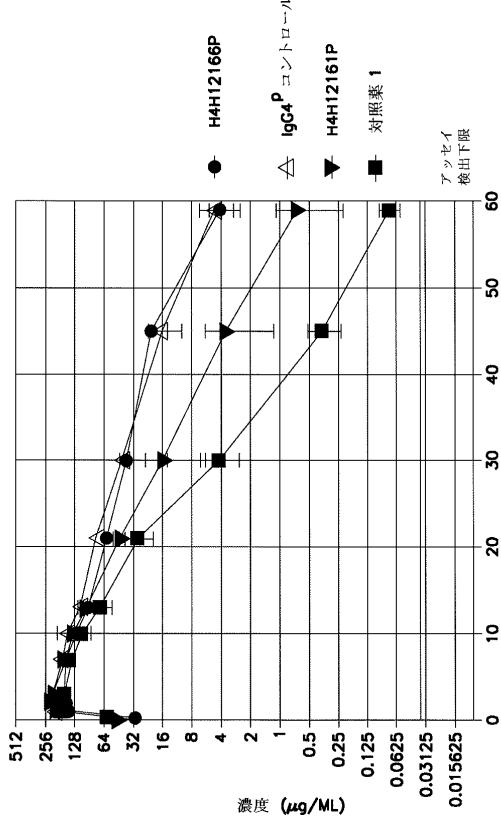
【図4】



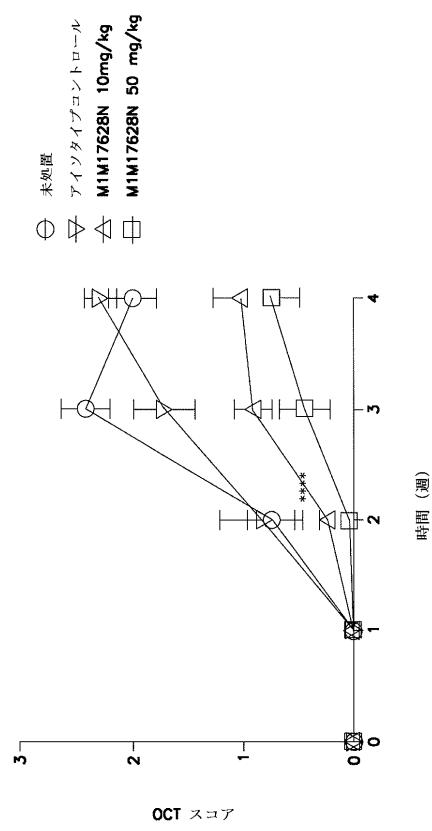
【図5】



【図6】



【図7】



10

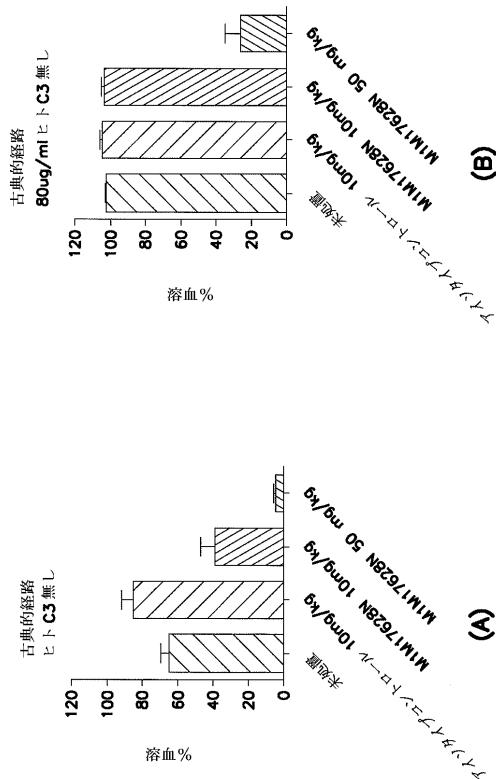
20

30

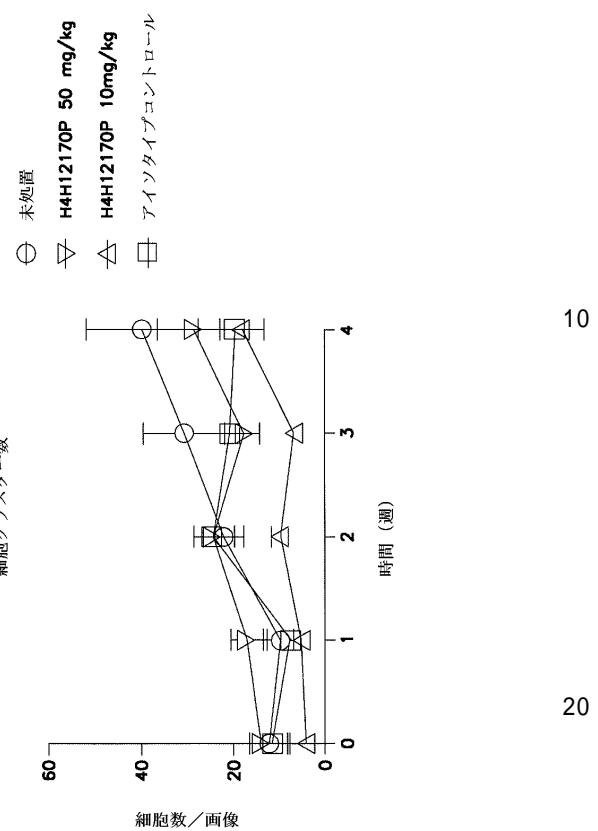
40

50

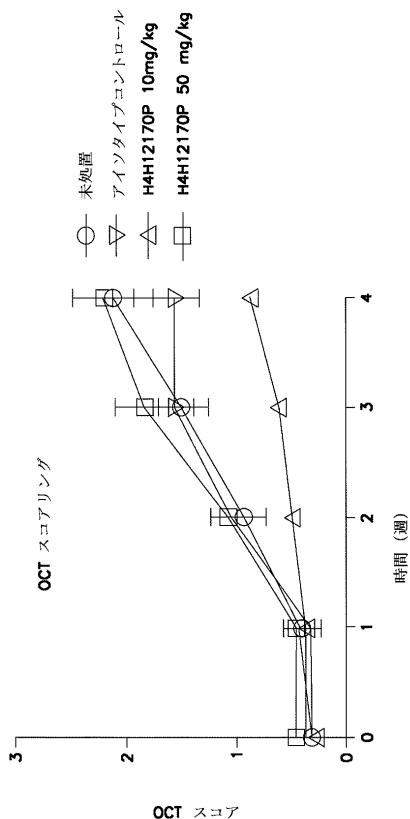
【図 8】



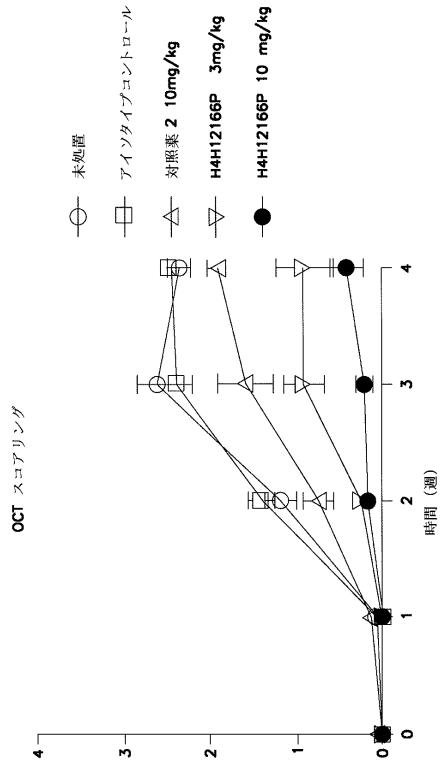
【図 9】



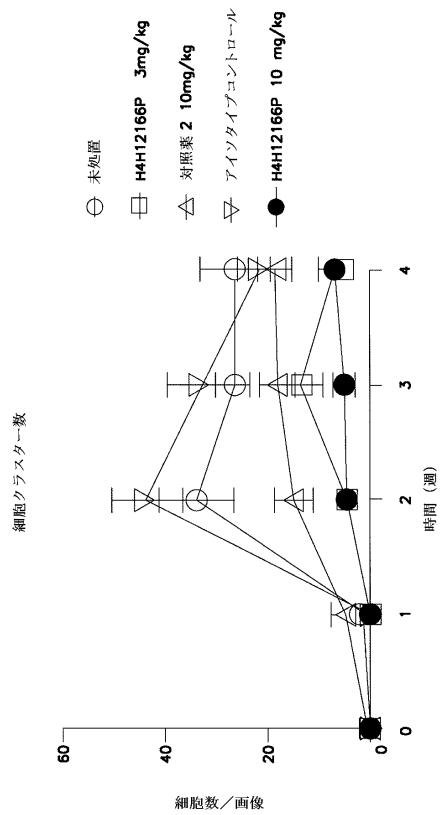
【図 10】



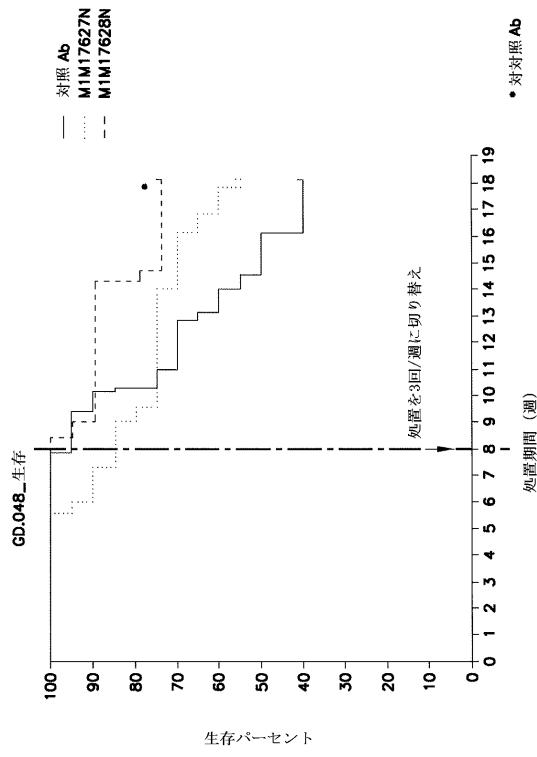
【図 11】



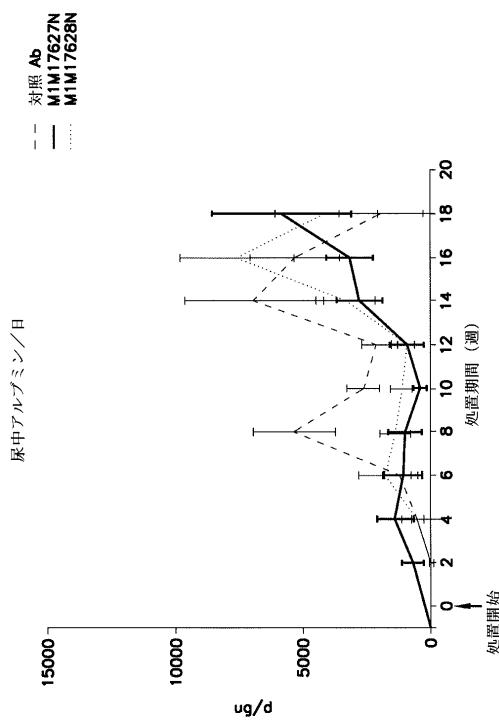
【図 1 2】



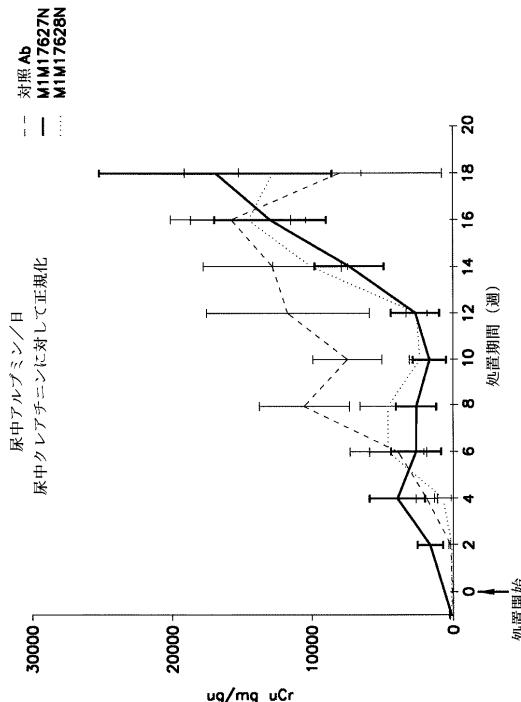
【図 1 3】



【図 1 4 A】



【図 1 4 B】



10

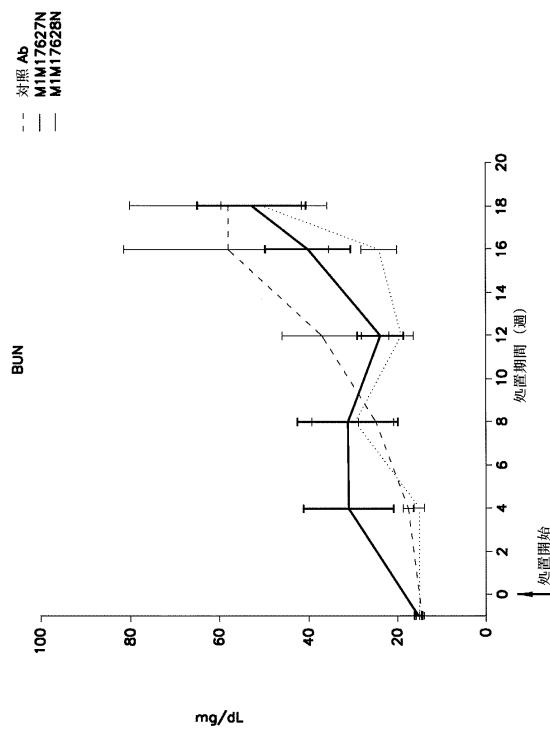
20

30

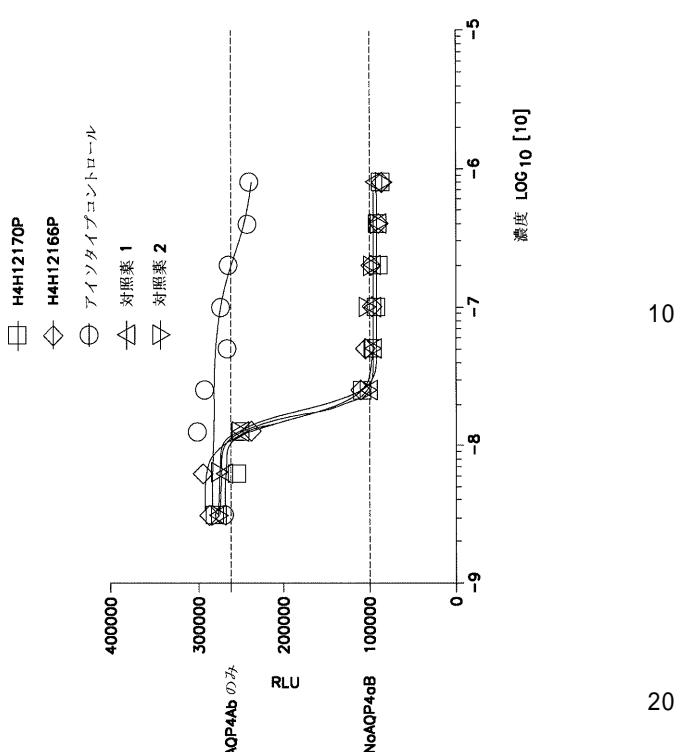
40

50

【図 1 5】



【図 1 6】



【配列表】

0007102353000001.app

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 9/10 101
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 777

(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 10591 . タリータウン . オールドソーミルリバーロード 777

(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 10591 . タリータウン . オールドソーミルリバーロード 777

(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 10591 . タリータウン . オールドソーミルリバーロード 777

審査官 竹内 祐樹

(56)参考文献 特表 2011 - 529700 (JP, A)

国際公開第 2014 / 047500 (WO, A1)

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

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 15 / 00 - 15 / 90

C 0 7 K 16 / 00 - 19 / 00

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