(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 048201 (13) B1

# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
**2024.11.07**

(21) Номер заявки
**202193274**

(22) Дата подачи заявки
**2017.06.13**

(51) Int. Cl. ***C07K 16/18*** (2006.01)
***C12P 21/08*** (2006.01)
***C12N 15/63*** (2006.01)

## (54) ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ, КОДИРУЮЩИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ C5, И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛ ПРОТИВ C5

(31) **62/349,705; 62/405,561; 62/422,107**
(32) **2016.06.14; 2016.10.07; 2016.11.15**
(33) **US**
(43) **2022.04.29**
(62) **201990022; 2017.06.13**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИДЖЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Ху Ин, Латуцек Адрианна, Романо Кармело, Олсон Уилльям (US)**

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

(56) WO-A1-2010015608
US-A1-2013064836
WONG E. K. S. et al. Anti-complement C5 therapy with eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and atypical hemolytic uraemic syndrome. Translational Research, 2015, 165(2), 306-320, doi:10.1016/j.trsl.2014.10.010, реферат

(57) Настоящее изобретение относится к выделенной молекуле полинуклеотида, кодирующей вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи антитела, которое специфически связывается с белком фактора 5 комплемента (C5). Изобретение также относится к вектору, содержащему указанную молекулу полинуклеотида, клетке, содержащей указанный вектор, и способу получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с белком фактора 5 комплемента (C5).

048201 B1

048201 B1

Эта заявка подана 13 июня 2017 г. как международная патентная заявка PCT и испрашивает преимущество приоритета предварительных заявок США №№ 62/349,705, поданной 14 июня 2016 г.; 62/405,561, поданной 7 октября 2016 г.; и 62/422,107, поданной 15 ноября 2016 г., раскрытия каждой включены в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте.

## Область изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые специфически связываются с фактором комплемента C5, и к терапевтическим и диагностическим способам использования этих антител.

## Предпосылки изобретения

Система комплемента представляет собой группу белков плазмы, которые при активации ведут к лизису клетки-мишени и содействуют фагоцитозу через опсонизацию. Комплемент активируют через серию протеолитических стадий по трем основным путям: классический путь, который обычно активируют иммунные комплексы, альтернативный путь, который могут индуцировать незащищенные клеточные поверхности, и путь маннозосвязывающего лектина. Все три пути каскада комплемента сходятся к протеолитическому расщеплению белка компонента 5 (C5) комплемента. Расщепление компонента 5 комплемента (C5) ведет к образованию фрагментов C5a и C5b, этот процесс критичен во время активации каскада комплемента. C5a может вызывать плейотропные физиологические ответы через связывание со своими рецепторами (Monk et al 2007, Br. J. Pharmacol. 152: 429-448). C5a является сильным провоспалительным медиатором, который индуцирует хемотаксическую миграцию, усиливает клеточную адгезию, стимулирует окислительный взрыв и индуцирует высвобождение различных медиаторов воспаления, таких как гистамин или цитокины. C5b опосредует формирование мембраноатакующего комплекса (MAC или C5b-9), что ведет к лизису клеток в поздних фазах комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). Кроме того, в ядросодержащих клетках, которые устойчивы к цитолизу посредством C5b-9, сублитические количества C5b-9 могут вызывать активацию клеток, результатом чего является клеточная пролиферация, образование провоспалительных медиаторов и продуцирование внеклеточного матрикса.

Моноклональные антитела к C5 известны в данной области и описаны, например, в патентах США/публикациях №№ 9206251, 9107861, 9079949, 9051365, 8999340, 8883158, 8241628, 7999081, 7432356, 7361339, 7279158, 6534058, 6355245, 6074642, 20160299305, 20160051673, 20160031975, 20150158936, 20140056888, 20130022615, 20120308559 и в WO2015198243, WO2015134894, WO2015120130, EP2563813B1, EP2328616B1 и EP2061810B1.

Антитела полностью человека, которые специфически связываются с белком C5 с высокой аффинностью и обладают усовершенствованными фармакокинетическими свойствами, могут быть важны при предотвращении и лечении различных C5-ассоциированных заболеваний (например, атипичного гемолитико-уремического синдрома).

## Краткая сущность изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают белок фактора 5 комплемента (C5). Антитела по настоящему изобретению можно использовать, inter alia, для ингибирования или нейтрализации активности белка C5. В определенных вариантах осуществления антитела можно использовать при предотвращении, лечении или улучшении по меньшей мере одного симптома или показания C5-ассоциированного заболевания или нарушения у субъекта. В определенных вариантах осуществления антитела можно вводить профилактически или терапевтически субъекту, который имеет риск наличия или имеет C5-ассоциированное заболевание или нарушение. В определенных вариантах осуществления антитела против C5 представляют собой антитела полностью человека, которые связываются с C5 с высокой аффинностью и обладают усовершенствованными фармакокинетическими (PK) и фармакодинамическими (PD) свойствами. Такие высокоаффинные антитела с усовершенствованной PK/PD можно использовать для обеспечения превосходящего эффекта, наряду с менее частым дозированием у субъекта с C5-ассоциированным заболеванием или нарушением.

Антитела по изобретению могут быть полноразмерными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, фрагмент Fab, $F(ab')_2$ или scFv), и их можно модифицировать для того, чтобы влиять на функциональность, например, чтобы увеличивать персистенцию в организме-хозяине или устранять остаточные эффекторные функции (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933). В определенных вариантах осуществления антитела могут быть биспецифическими.

В первом аспекте, настоящее изобретение предусматривает выделенные рекомбинантные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются специфически с белком C5. В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой моноклональные антитела полностью человека.

Образцовые антитела против C5 по настоящему изобретению перечислены в табл. 1 и 2 в настоящем описании. В табл. 1 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR), вариабельных областей легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) образцовых антител против C5. В табл. 2 приве-

дены идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты для HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 образцовых антител против C5.

Настоящее изобретение предусматривает антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, или по существу схожей с ними последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, которые содержат LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1, или по существу схожей с ними последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, которые содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любые аминокислотные последовательности HCVR, перечисленные в табл. 1, в паре с любыми аминокислотными последовательностями LCVR, перечисленными в табл. 1. В соответствии с определенными вариантами осуществления, настоящее изобретение предусматривает антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащихся в любых образцовых антителах против C5, перечисленных в табл. 1. В определенных вариантах осуществления пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 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 и 338/346. В определенных вариантах осуществления пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбирают из одной из SEQ ID NO: 50/58 (например, H4H12161P), 98/106 (например, H4H12166P), 138/106 (например, H4H12166P5) или 202/210 (например, H4H12170P). В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела против C5 или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCVR и LCVR, указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность, перечисленную в табл. 1, имеющую не больше пяти замен аминокислот, и указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность, перечисленную в табл. 1, имеющую не больше двух замен аминокислот. Например, настоящее изобретение предусматривает антитела против C5 или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCVR и LCVR, указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, имеющую не больше пяти замен аминокислот, и указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, имеющую не больше двух замен аминокислот. В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела против C5 или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCVR и LCVR, указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, имеющую по меньшей мере одну замену аминокислоты, и указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, имеющую одну замену аминокислоты.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, которые содержат CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 1, или по существу схожей с ними последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, которые содержат CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в табл. 1, или по существу схожей с ними последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, которые содержат CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1, или по существу схожей с ними последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, которые содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в табл. 1, или по существу схожей с ними последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, которые содержат CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в табл. 1, или по существу схожей с ними последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%,

по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, которые содержат CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1, или по существу схожей с ними последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, которые содержат пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любые аминокислотные последовательности HCDR3, перечисленные в табл. 1, в паре с любыми аминокислотными последовательностями LCDR3, перечисленными в табл. 1. В соответствии с определенными вариантами осуществления, настоящее изобретение предусматривает антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любых образцовых антителах против C5, перечисленных в табл. 1. В определенных вариантах осуществления пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 56/64 (например, H4H12161P), 104/112 (например, H4H12166P), 144/112 (например, H4H12166P5), и 208/216 (например, H4H12170P).

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, которые содержат HCVR и LCVR, указанная HCVR содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, перечисленной в табл. 1, на 1 аминокислоту, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, перечисленной в табл. 1, на 1 аминокислоту, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, перечисленной в табл. 1, на 1 аминокислоту. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат HCVR и LCVR, указанная LCVR содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, перечисленной в табл. 1, на 1 аминокислоту, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, перечисленной в табл. 1, на 1 аминокислоту, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, перечисленной в табл. 1, на 1 аминокислоту. Например, настоящее изобретение предусматривает антитела против C5, или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат HCVR и LCVR, указанная HCVR содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 100 на 1 аминокислоту, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 102 на 1 аминокислоту, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 104 на 1 аминокислоту. В другом образцовом варианте осуществления, настоящее изобретение предусматривает антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат HCVR и LCVR, указанная LCVR содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 108 на 1 аминокислоту, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 110 на 1 аминокислоту, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 112 на 1 аминокислоту.

Настоящее изобретение предусматривает антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 353, или по существу схожую с ней последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ней.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, которые содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 354 или по существу схожую с ней последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ней.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 353 или по существу схожую с ней последовательность, обладающую по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей с ней; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 354 или по существу схожую с ней последовательность, обладающую по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей с ней.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, которые содержат набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержа-

щийся в любом из образцовых антител против C5, перечисленных в табл. 1. В определенных вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 52-54-56-60-62-64 (например, H4H12161P), 100-102-104-108-110-112 (например, H4H12166P), 140-142-144-108-110-112 (например, H4H12166P5) и 204-206-208-212-214-216 (например, H4H12170P).

В связанном варианте осуществления, настоящее изобретение предусматривает антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как определено с помощью любых образцовых антител против C5, перечисленных в таблице 1. Например, настоящее изобретение включает антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50/58 (например, H4H12161P), 98/106 (например, H4H12166P), 138/106 (например, H4H12166P5) или 202/210 (например, H4H12170P). Способы и приемы идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области, и их можно использовать для того, чтобы идентифицировать CDR в конкретных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрытых в настоящем описании. Образцовые конвенции, которые можно использовать для того, чтобы идентифицировать границы CDR, включают, например, определение Kabat, определение Chothia и определение AbM. Вообще говоря, определение Kabat основано на вариабельности последовательностей, определение Chothia основано на местоположении областей структурных петель, а определение AbM представляет собой компромисс между подходами Kabat и Chothia. См., например, 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); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Публичные базы данных также доступны для идентификации последовательностей CDR в антителе.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с C5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), где HCVR содержит: (i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, (ii) аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 98, (iii) аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 98; или (iv) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, имеющую не больше 5 замен аминокислот; и LCVR содержит: (i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, (ii) аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 106, (iii) аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 106; или (iv) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, имеющую не больше 5 замен аминокислот.

Настоящее изобретение включает антитела против C5, имеющие модифицированный паттерн гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления можно использовать модификацию для того, чтобы удалять нежелательные участки гликозилирования, или антитело, не содержащее фрагмент фукозы, присутствующий на олигосахаридной цепи, например, для увеличения функции антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других применениях можно выполнять модификацию галактозилирования для того, чтобы модифицировать комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC).

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют pH-зависимое связывание с C5. Например, настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают C5 с более высокой аффинностью при нейтральном pH, чем при кислом pH (т.е. сниженное связывание при кислом pH).

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые проявляют усовершенствованные фармакокинетические и фармакодинамические свойства, например, настоящее изобретение предусматривает антитела против C5, которые обладают увеличенным временем полужизни в сыворотке. В определенных вариантах осуществления антитела против C5 по настоящему изобретению имеют концентрацию в сыворотке больше чем 10 мкг/мл до суток 40 у C5-гуманизированных мышей. В определенных вариантах осуществления антитела против C5 по настоящему изобретению блокируют CP и AP гемолиз до суток 35 при введении C5-гуманизированным мышам.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые конкурируют за специфическое связывание с C5 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим CDR из HCVR и CDR из LCVR, где каждая HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые перекрестно конкурируют за связывание с C5 с эталонным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим CDR из HCVR и CDR из LCVR, где каждая HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с тем же эпитопом, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR из HCVR и CDR из LCVR, где каждая HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR из HCVR и CDR из LCVR, где пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR имеет SEQ ID NO: 98/106.

Настоящее изобретение также относится к антителам против C5 и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с одним или несколькими аминокислотными остатками, содержащимися в α цепь и/или β цепи C5. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с одной или несколькими аминокислотами в α цепи C5 и одной или несколькими аминокислотами в β цепи C5. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с одной или несколькими аминокислотами в α и β цепях C5, где антитела не связываются с доменом анафилатоксина C5a. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела против C5, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, содержащимися в C5 человека (SEQ ID NO: 359). В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела против C5, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, содержащимися в C5 человека (SEQ ID NO: 359), где антитела не связываются с доменом анафилатоксина C5a из C5. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела против C5 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые взаимодействуют с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из (a) аминокислот с 591 до 599 из SEQ ID NO: 359; (b) аминокислот с 593 до 599 из SEQ ID NO: 359; (c) аминокислот с 775 до 787 из SEQ ID NO: 359; (d) аминокислот с 775 до 794 из SEQ ID NO: 359; и (e) аминокислот с 779 до 787 из SEQ ID NO: 359. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела против C5 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, содержащимися в SEQ ID NO: 359, например, настоящее изобретение предусматривает антитела против C5 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые взаимодействуют с по меньшей мере 5 аминокислотами, по меньшей мере 10 аминокислотами или по меньшей мере 15 аминокислотами, содержащимися в SEQ ID NO: 361. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела против C5 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, содержащимися в SEQ ID NO: 359, например, настоящее изобретение предусматривает антитела против C5 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые взаимодействуют с по меньшей мере 5 аминокислотами, содержащимися в SEQ ID NO: 360. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела против C5 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые взаимодействуют с по меньшей мере 5 аминокислотами, содержащимися в SEQ ID NO: 360 и 361. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела против C5 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые взаимодействуют с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 360 (соответствующей аминокислотам с 591 до 599 из SEQ ID NO: 359) и с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 361 (соответствующей аминокислотам с 775 до 794 из SEQ ID NO: 359).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может связываться специфически с C5 агонистическим образом, т.е. они могу усиливать или стимулировать связывание и/или активность C5; в других вариантах осуществления антитело может связываться специфически с C5 антагонистическим образом, т.е. оно может блокировать связывание и/или активность C5.

Настоящее изобретение также относится к выделенным антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые блокируют связывание C5 с C5-конвертазой. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые блокируют связывание C5 с C5-конвертазой, могут связываться с тем же эпитопом на C5, что и C5-конвертаза, или могут связываться с другим эпитопом на C5, нежели C5-конвертаза. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют связывание C5 с C5-конвертазой обезьяны.

В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению являются биспецифическими и имеют первую специфичность связывания с первым эпитопом белка C5 и вторую специфичность связывания со вторым эпитопом белка C5, где первый

и второй эпитопы являются различными и не перекрывающимися.

В определенных вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связываются с C5a с $IC_{50}$ меньше чем 0,5 нМ. В определенных вариантах осуществления антитела содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 290, 306, 322 и 338. В определенных вариантах осуществления антитела содержат LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 298, 314, 330 и 346.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые имеют одну или несколько следующих характеристик: (a) представляет собой моноклональное антитело полностью человека; (b) связывается с C5 человека с константой диссоциации ($K_D$) меньше чем 0,9 нМ при 25°C, как измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (c) связывается с C5 человека с $K_D$ меньше чем 0,3 нМ при 37°C, как измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (d) связывается с C5 обезьяны с $K_D$ меньше чем 65 нМ, как измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (e) связывается с вариантом C5 человека R885H (SEQ ID NO: 356) с $K_D$ меньше чем 0,5 нМ, как измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (f) связывается с вариантом C5 человека R885C (SEQ ID NO: 357) с $K_D$ меньше чем 0,5 нМ, как измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (g) блокирует опосредованный C5 человека классический путь (CP) гемолиза больше чем на 95% и с $IC_{50}$ меньше чем 6 нМ, как измеряют в анализе CP гемолиза; (h) блокирует опосредованный C5 человека альтернативный путь (AP) гемолиза больше чем на 70% и с $IC_{50}$ меньше чем 165 нМ, как измеряют анализе AP гемолиза; (i) ингибирует опосредованный C5 африканской зеленой мартышки CP гемолиз с $IC_{50}$ меньше чем 185 нМ, как измеряют в анализе CP гемолиза; (j) ингибирует опосредованный C5 африканской зеленой мартышки AP гемолиз с $IC_{50}$ меньше чем 235 нМ, как измеряют анализе AP гемолиза; (k) ингибирует опосредованный C5 яванского макака CP гемолиз с $IC_{50}$ меньше чем 145 нМ, как измеряют в анализе CP гемолиза; и (l) ингибирует опосредованный C5 яванского макака AP гемолиз с $IC_{50}$ меньше чем 30 нМ, как измеряют анализе AP гемолиза.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает выделенное рекомбинантное моноклональное антитело против C5 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые имеют одну или несколько следующих характеристик: (a) содержит набор из шести CDR, содержащих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 100-102-104-108-110-112; (b) связывается с C5 человека с константой диссоциации ($K_D$) меньше чем 0,2 нМ при 25°C, как измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (c) связывается с C5 человека с $K_D$ меньше чем 0,3 нМ при 37°C, как измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (d) связывается с вариантом C5 человека (R885H) с $K_D$ меньше чем 0,4 нМ при 37°C, как измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (e) ингибирует опосредованный классическим путем (CP) гемолиз в сыворотке человека с $IC_{50}$ меньше чем 3 нМ; (f) ингибирует опосредованный альтернативным путем (AP) гемолиз в сыворотке человека с $IC_{50}$ меньше чем 27 нМ; (g) ингибирует CP-опосредованный гемолиз в сыворотке обезьяны с $IC_{50}$ меньше чем 21 нМ; (g) ингибирует AP-опосредованный гемолиз в сыворотке обезьяны с $IC_{50}$ меньше чем 10 нМ; (h) имеет время полужизни в сыворотке ($t_{1/2}$) больше чем 10 суток у C5-гуманизированных мышей; (i) имеет концентрацию в сыворотке больше чем 10 мкг/мл до суток 40 при введении C5-гуманизированным мышам; (j) блокирует CP-опосредованный гемолиз до суток 50 у C5-гуманизированных мышей; и (k) связывается с одной или несколькими аминокислотами, содержащимися в α цепи и/или β цепи SEQ ID NO: 359, где антитело не связывается с доменом анафилатоксина C5a из C5.

Во втором аспекте, настоящее изобретение предусматривает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела против C5 или их части. Например, настоящее изобретение предусматривает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любые аминокислотные последовательности HCVR, перечисленные в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу схожей с ними последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любые аминокислотные последовательности LCVR, перечисленные в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу схожей с ними последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любые аминокислотные последовательности HCDR1, перечисленные в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR1, перечисленных в табл. 2, или по существу схожей с ними последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%,

по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любые аминокислотные последовательности HCDR2, перечисленные в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR2, перечисленных в табл. 2, или по существу схожей с ними последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любые аминокислотные последовательности HCDR3, перечисленные в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR3, перечисленных в табл. 2, или по существу схожей с ними последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любые аминокислотные последовательности LCDR1, перечисленные в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR1, перечисленных в табл. 2, или по существу схожей с ними последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любые аминокислотные последовательности LCDR2, перечисленные в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR2, перечисленных в табл. 2, или по существу схожей с ними последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любые аминокислотные последовательности LCDR3, перечисленные в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR3, перечисленных в табл. 2, или по существу схожей с ними последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим HCVR, где HCVR содержит набор из трех CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3), где набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 представляет собой то, что определено с помощью любых образцовых антител против C5, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим LCVR, где LCVR содержит набор из трех CDR (т.е. LCDR1-LCDR2-LCDR3), где набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 представляет собой то, что определено с помощью любых образцовых антител против C5, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим как HCVR, так и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, и где LCVR содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу схожей с ними последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в табл. 1, или по существу схожей с ними последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними. В определенных вариантах осуществления в соответствии с этим аспектом изобретения, молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где и HCVR и LCVR получены из одного и того же антитела против C5, перечисленного в табл. 1.

В связанном аспекте, настоящее изобретение предусматривает рекомбинантные экспрессирующие векторы, способные экспрессировать полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой или легкой цепи антитела против C5. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные экспрессирующие векторы, содержащие любые молекулы нуклеиновой кислоты, указанные выше, т.е. молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любые последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, как изложено в табл. 2. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые введены такие векторы, а также способы получения антител или их частей посредством культивирования клеток-хозяев в условиях, допускающих получение антител или фрагментов антител и извлечение антител и фрагментов антител, полученных таким образом.

В третьем аспекте, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного рекомбинантного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связывают C5, и фармацевтически приемлемый носитель. В связанном аспекте, изобретение отличается композицией, которая представляет собой комбинацию антитела против C5 и второго терапевтического средства. В одном из вариантов осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, которое благоприятно объединяют с антителом против C5. Образцовые средства, которые могут быть полезно объединены с антителом против C5, включают, без ограничения, другие средства, которые связывают и/или ингибируют активность C5 (в том числе другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и т.д.), и/или средства, которые непосредственно не связывают C5, но тем не менее лечат или улучшают по меньшей мере один симптом или показание C5-ассоциированного заболевания или нарушения. Дополнительная комбинированная терапия и комбинированные составы с вовлечением антител против C5 по настоящему изобретению раскрыты в другом месте в настоящем описании.

В четвертом аспекте, изобретение относится к терапевтическим способам для лечения заболевания или нарушения, связанного с C5, у субъекта с использованием антитела против C5 или антигенсвязывающей части антитела по изобретению, где терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела по изобретению, субъекту, нуждающемуся в этом. Нарушение, которое лечат, представляет собой любое заболевание или состояние, которое усовершенствуют, улучшают, ингибируют или предотвращают посредством ингибирования активности C5. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к способам предотвращения, лечения или улучшения по меньшей мере одного симптома атипичного гемолитико-уремического синдрома (aHUS), способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела против C5 или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы улучшения или снижения тяжести по меньшей мере одного симптома или показания пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH) у субъекта посредством введения антитела против C5 по изобретению. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить профилактически или терапевтически субъекту с наличием или риском наличия C5-ассоциированного заболевания или нарушения. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством субъекту, нуждающемуся в этом. Второе терапевтическое средство можно выбирать из группы, состоящей из противовоспалительного лекарственного средства (такого как кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства), другого антитела к белку C5, пищевой добавки, такой как антиоксиданты, и любого другого лекарственного средства или терапии, известных в данной области. В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство может представлять собой средство, которое помогает противодействовать или снижать любой возможный побочный эффект(ы), связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению, если такой побочный эффект(ы) должен проявиться. Антитело или его фрагмент можно вводить подкожно, внутривенно, внутрикожно, интраперитонеально, перорально или внутримышечно. Антитело или его фрагмент можно вводить в дозе приблизительно от 0,1 мг/кг массы тела приблизительно до 100 мг/кг массы тела субъекта. В определенных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению можно вводить в одной или нескольких дозах, составляющих между 50 и 600 мг.

Настоящее изобретение также относится к применению антитела против C5 или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению при изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения, для которого будет полезна блокада связывания и/или активности C5.

Другие варианты осуществления будут видны при просмотрен следующего подробного описания.

**Краткое описание фигур**

На фиг. 1 представлено ингибирование уровней C5a антителом против C5 H4H12166P в зависимости от дозы, как определяют посредством ELISA (описано в примере 9 в настоящем описании).

На фиг. 2 представлена общая концентрация в сыворотке в зависимости от времени после одной 15 мг/кг внутривенной инъекции H4H12166P, H4H12161P или объекта сравнения 2 самцам яванского макака (описано в примере 10 в настоящем описании). Профили концентрация-время наносили на график от первого после дозы до результата на пределе количественного определения (BLQ), если применимо, который рассчитывали как LLOQ/2. Каждая точка данных представляет среднее (+SD) (n=4 животных/группа); концентрации, на которые, как предполагали, находились под влиянием ADA, исключали у 1 животного в группе H4H12166P и 1 животного в группе H4H12161P, начиная с суток 36 и суток 29, соответственно. LLOQ=нижний предел количественного определения.

На фиг. 3 представлен процент гемолиза в зависимости от времени ex vivo в красных клетках крови для анализов (A) классического пути и (B) альтернативного пути после одной внутривенной инъекции H4H12166P, H4H12161P или объекта сравнения 2 самцам яванского макака. % гемолиза, вычисляемый как соотношение экспериментального и максимального лизиса за вычетом % фонового лизиса из обоих значений, связан с количеством C5, ингибированного конкретным антителом против C5, присутствую-

щим в сыворотке в данный момент времени. Каждая точка данных представляет среднее (±SD).

На фиг. 4 представлены профили общей концентрации в сыворотке в зависимости от времени для выбранных антител против C5 у мышей, гуманизированных по C5 (описано в примере 11 в настоящем описании). Гуманизированным C5 мышам вводили одну 15 мг/кг подкожную дозу H4H12166P, объект сравнения 1 или объект сравнения 2. Каждая точка данных представляет среднее±SEM (n=4-5 кажд.). Осуществляли мониторинг концентраций антител в сыворотках через 1, 10, 20, 30 и 40 суток после инъекции с использованием сэндвич ELISA.

На фиг. 5 представлен процент гемолиза в зависимости от времени ex vivo в анализе гемолиза по классическому пути комплемента для выбранных антител против C5 у мышей, гуманизированных по C5. Гуманизированным C5 мышам вводили одну 15 мг/кг подкожную дозу H4H12166P, объекта сравнения 1 или объекта сравнения 2. Каждая точка данных представляет среднее±SEM (n=4-5 кажд.). Осуществляли мониторинг процента гемолиза в сыворотке перед дозой, через 10, 20, 30, 40 и 50 суток после инъекции. % гемолиз, который вычисляли как соотношение экспериментального и максимального лизиса за вычетом % фонового лизиса из обоих значений, связан с количеством C5, ингибированного конкретным антителом против C5, присутствующим в сыворотке в данный момент времени.

На фиг. 6 представлены профили общей концентрации в сыворотке в зависимости от времени для выбранных антител против C5 у мышей, гуманизированных по C5 (описано в примере 11 в настоящем описании). Мышам вводили одну 15 мг/кг подкожную дозу H4H12166P, H4H12161P, объекта сравнения 1 или изотипического контроля IgG4P. Каждая точка данных представляет среднее±SEM (n=5 кажд.). Осуществляли мониторинг уровней антител в сыворотках через 6 ч, 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 21, 30, 45 и 59 суток после инъекции с использованием сэндвич ELISA.

На фиг. 7 представлен график, показывающий оценки оптической когерентной томографии (OCT) у мышей, которых лечили изотипическим контролем или антителом против C5 M1M17628N по 10 мг/кг или 50 мг/кг (описано в примере 14 в настоящем описании). ****$p<0,0001$, двухфакторный дисперсионный анализ лечения антителом против C5 по 50 мг/кг в сравнении с отсутствием лечения или лечением изотипическим контролем.

На фиг. 8 представлено ингибирование гемолиза по классическому пути антителом против C5 M1M17628N в отсутствие C3 (A); и в присутствии 80 мкг/мл C3 человека (B) (описано в примере 14 в настоящем описании).

На фиг. 9 представлено число клеточных кластеров у C5 гуманизированных мышей, которых лечили изотипическим контролем или антителом против C5 человека H4H12170P по 10 мг/кг или 50 мг/кг (описано в примере 15 в настоящем описании). n=8-12 глаз для каждой группы.

На фиг. 10 представлен график, показывающий оценки OCT у C5 гуманизированных мышей, которых лечили изотипическим контролем или антителом против C5 человека H4H12170P по 10 мг/кг или 50 мг/кг (описано в примере 15 в настоящем описании). n=8-12 глаз для каждой группы.

На фиг. 11 представлен график, показывающий оценки OCT у C5 гуманизированных мышей, которых лечили изотипическим контролем, антителом против C5 человека H4H12166P по 3 мг/кг или 10 мг/кг или объектом сравнения 2 по 10 мг/кг. n=6-12 глаз для каждой группы (описано в примере 15 в настоящем описании).

На фиг. 12 представлено число клеточных кластеров у C5 гуманизированных мышей, которых лечили изотипическим контролем, антителом против C5 человека.

H4H12166P по 3 мг/кг или 10 мг/кг или объектом сравнения 2 по 10 мг/кг. n=6-12 глаз для каждой группы (описано в примере 15 в настоящем описании).

На фиг. 13 представлена кривая выживаемости мышей NZBWF1, которых лечили изотипическим контролем или антителами против C5 M1M17628N или M1M17627N (описано в примере 17 в настоящем описании).

На фиг. 14 представлены уровни (A) альбумин в моче и (B) альбумин в моче, нормализованного по креатинину в моче, у мышей NZBWF1, которых лечили изотипическим контролем или антителами против C5 M1M17628N или M1M17627N (описано в примере 17 в настоящем описании).

На фиг. 15 представлены уровни азота мочевины в крови у мышей NZBWF1, которых лечили изотипическим контролем или антителами против C5 M1M17628N или M1M17627N (описано в примере 17 в настоящем описании).

На фиг. 16 представлен график, показывающий ингибирование антитело-зависимой цитотоксичности для астроцитов посредством антител против C5 H4H12166P, H4H12170P, объекта сравнения 1 и объекта сравнения 2, как описано в примере 18.

**Подробное описание**

Перед описанием данных способов следует понимать, что это изобретение не ограничено конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, по существу способы и условия могут варьировать. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем описании, служит только цели описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена в качестве ограничения, поскольку объем настоящего изобретения ограничен только приложенной формулой изобретения.

Пока не определено иное, все технические и научные термин, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, в каком их обычно понимает специалист в области, к которой относится это изобретение. Несмотря на то, что любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем описании, можно использовать при практической реализации или тестировании настоящего изобретения, предпочтительные способы и материалы описаны далее. Все публикации, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

Определения.

Термин "C5", также называемый "компонентом 5 комплемента" или "фактор комплемента 5", относится к белку сыворотки из каскада комплемента. Белок C5 представляет собой белок из 1676 аминокислот, который содержит две цепи, α и β. Белок является точкой схождения трех путей активации комплемента: классического пути, альтернативного пути и пути маннозосвязывающего лектина. Аминокислотная последовательность полноразмерного белка C5 приведена в качестве примера в аминокислотной последовательности, предоставленной в GenBank под номером доступа NP_001726.2 (SEQ ID NO: 355). Термин "C5" включает рекомбинантный белок C5 или его фрагмент. Термин также охватывает белок C5 или его фрагмент, сопряженный, например, с гистидиновой меткой, Fc мыши или человека или сигнальной последовательностью, такой как ROR1. Например, термин включает последовательности, примерами которых являются последовательности, представленные в SEQ ID NO: 356 или 357, которые содержат на C-конце гистидиновую метку, сопряженную с аминокислотными остатками 19-1676 полноразмерного белка C5. Термин также включает варианты белков, которые содержат гистидиновую метку на C-конце, сопряженную с аминокислотными остатками 19-1676 полноразмерного белка C5 с заменой R885H или заменой R885C.

Термин "антитело", как используют в настоящем описании, предназначен для обозначения молекул иммуноглобулинов, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных дисульфидными связями (т.е. "полные молекулы антител"), а также их мультимеров (например, IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи ("HCVR" или "$V_H$") и константной области тяжелой цепи (состоит из доменов $C_H1$, $C_H2$ и $C_H3$). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи ("LCVR или "$V_L$") и константной области легкой цепи ($C_L$). Области $V_H$ и $V_L$ дополнительно можно подразделять на области гипервариабельности, обозначаемые определяющими комплементарность областями (CDR), которые чередуются с областями, которые более консервативны и которые называют каркасными областями (FR). Каждая $V_H$ и $V_L$ состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В определенных вариантах осуществления FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Консенсусную аминокислотную последовательность можно определять на основе сравнительного анализа двух или больше CDR.

Также возможна замена одного или нескольких остатков CDR или пропуск одной или нескольких CDR. В научной литературе описаны антитела, в которых могут быть распределены одна или две CDR для связывания. Padlan et al. (1995 FASEB J. 9:133-139) анализировали области контакта между антителами и их антигенами на основе опубликованных кристаллических структур и заключали, что только приблизительно от одной пятой до одной третьей остатков CDR фактически контактируют с антигеном. Padlan также обнаружил множество антител, в которых одна или две CDR не имеют аминокислот в контакте с антигеном (см. также Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320:415-428).

Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, можно идентифицировать на основе предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 часто не требуются), в областях CDR по Kabat, лежащих вне CDR по Chothia, посредством молекулярного моделирования и/или эмпирически. Если CDR или ее остаток(остатки) пропускают, обычно ее заменяют на аминокислоту, занимающую соответствующее положение в другой последовательности антитела человека или консенсусе таких последовательностей. Положения для замены в CDR и аминокислоты для замен также можно выбирать эмпирически. Эмпирические замены могут представлять собой консервативные или неконсервативные замены.

Моноклональные антитела полностью человека против C5, раскрытые в настоящем описании, могут содержать одну или несколько замен, инсерций и/или делеций аминокислот каркасных и/или CDR областях вариабельных доменов тяжелых и легких цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации легко определять посредством сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем описании, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, в публичных базах данных о последовательностях антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получают из любых аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем описании, в которых одну или несколько аминокислот в одной или нескольких каркасных и/или CDR областях мутируют в соответствующий остаток(остатки) последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело, или в соответствующий остаток(остатки) другой последовательности зародышевой линии человека, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие замены в после-

довательности обозначают в настоящем описании в совокупности как "генеративные мутации"). Специалист в данной области, начиная с последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей, раскрытых в настоящем описании, может легко получать множество антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или несколько индивидуальных генеративных мутаций или их сочетания. В определенных вариантах осуществления все остатки каркаса и/или CDR в доменах $V_H$ и/или $V_L$ мутируют обратно в остатки, встречающиеся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой антитело получено. В других вариантах осуществления только определенные остатки мутируют обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например, только мутированные остатки, встречающиеся в пределах первых 8 аминокислот в FR1 или в пределах последних 8 аминокислот в FR4, или только мутированные остатки, встречающиеся в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или несколько остатков каркаса и/или CDR мутируют в соответствующие остатки другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой антитело исходно получено). Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или больше генеративных мутаций в каркасных и/или CDR областях, например, где определенные индивидуальные остатки мутируют в соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, тогда как определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняют или мутируют в соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. Когда получены, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько генеративных мутаций, можно легко тестировать на одно или несколько желаемых свойств, таких как усовершенствованная специфичность связывания, увеличенная аффинность связывания, усовершенствованные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от случая), сниженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, получаемые таким общим путем, включены в настоящее изобретение.

Настоящее изобретение также относится к моноклональным антителам полностью человека против C5, содержащим варианты любых аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем описании, которые имеют одну или несколько консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает антитела против C5, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем описании.

Термин "антитело человека", как используют в настоящем описании, предназначен включать антитела, имеющие вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов человека эмбрионального типа. mAb человека по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов человека эмбрионального типа (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом in vitro или с помощью соматической мутации in vivo), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Однако термин "антитело человека", как используют в настоящем описании, не предназначен включать mAb, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии млекопитающих других биологических видов (например, мыши), пересажены в последовательности FR человека. Термин включает антитела, рекомбинантно полученные у не относящегося к человеку млекопитающего или в клетках не относящегося к человеку млекопитающего. Термин не предназначен включать антитела, выделенные у человеческого субъекта или созданные в нем.

Термин "рекомбинантный", как используют в настоящем описании, относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам по изобретению, которые создают, экспрессируют, выделяют или получают посредством технологий или известные в данной области способов, как технология рекомбинантных ДНК, которая включает, например, сплайсинг ДНК и трансгенную экспрессию. Термин относится к антителам, экспрессируемым у не относящегося к человеку млекопитающего (в том числе трансгенные не относящиеся к человеку млекопитающие, например, трансгенные мыши) или в клеточной экспрессирующей системе (например, клетках CHO) или выделенным из комбинаторной библиотеки рекомбинантных антител человека.

Термин "специфически связывает" или "специфически связывается с" или тому подобное обозначает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который относительно стабилен при физиологических условиях. Специфическое связывание можно охарактеризовать равновесной константой диссоциации по меньшей мере приблизительно $1\times10^{-8}$M или меньше (например, более низкая $K_D$ обозначает более прочное связывание). Способы определения того, специфически ли связываются две молекулы, хорошо известны в данной области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Как раскрыто в настоящем описании, с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™, идентифицированы антитела, которые связываются специфически с C5. Кроме того, полиспецифические антитела, которые связываются с одним доменом в C5 и одним или несколькими дополнительными антигенами, или биспецифические, кото-

рые связываются с двумя различными областями в C5, тем не менее, представляют собой рассматриваемые антитела, которые "специфически связываются", как используют в настоящем описании.

Термин "высокоаффинное" антитело относится к тем mAb, которые обладают аффинностью связывания с C5, выражаемой в виде $K_D$, по меньшей мере $10^{-8}$M; предпочтительно $10^{-9}$M; более предпочтительно $10^{-10}$M, даже более предпочтительно $10^{-11}$M, даже более предпочтительно $10^{-12}$M, как измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™ или ELISA аффинности в растворе.

Под термином "низкая скорость диссоциации", "$K_{off}$" или "$k_d$" понимают, что антитело диссоциирует с C5 с константой скорости $1\times10^{-3}$ $c^{-1}$ или меньше, предпочтительно $1\times10^{-4}$ $c^{-1}$ или меньше, как определяют посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™.

Термин "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п., как используют в настоящем описании, включают любые встречаемые в природе, получаемые ферментативно, синтетические или генетически сконструированные полипептиды или гликопротеины, которые специфически связывают антиген для того, чтобы формировать комплекс. Термин "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела", как используют в настоящем описании, относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с белком C5.

В конкретных вариантах осуществления, антитело или фрагменты антител по изобретению можно конъюгировать с фрагментом, таким как лиганд или терапевтический фрагмент ("иммуноконъюгат"), второе антитело против C5 или любой другой терапевтический фрагмент, который можно использовать для лечения C5-ассоциированного заболевания или нарушения.

"Выделенное антитело", как используют в настоящем описании, предназначено для обозначения антитела, которое по существу не содержит другие антитела (Ab), обладающие другими антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфически связывает C5, или его фрагмент, по существу не содержит Ab, которые специфически связывают антигены, отличные от C5.

"Блокирующее антитело" или "нейтрализующее антитело", как используют в настоящем описании (или "антитело, которое нейтрализует активность C5" или "антагонистическое антитело"), предназначено для обозначения антитела, у которого связывание с C5 ведет к ингибированию по меньшей мере одной биологической активности C5. Например, антитело по изобретению может предотвращать или блокировать комплемент-опосредованный гемолиз по классическому пути или альтернативному пути.

Термин "поверхностный плазмонный резонанс", как используют в настоящем описании, относится к оптическому феномену, который делает возможным анализ биомолекулярных взаимодействий в реальном времени посредством обнаружения изменений в концентрациях белков на матрице биосенсора, например, с использованием системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden и Piscataway, N. J.).

Термин "$K_D$", как используют в настоящем описании, предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминнте, которая взаимодействует с конкретным антигенсвязывающим участком в вариабельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь больше чем один эпитоп. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными участками на антигене и могут иметь различные биологические эффекты. Термин "эпитоп" также относится к месту на антигене, на который отвечают B- и/или T-клетки. Также он относится к области антигена, которую связывает антитело. Эпитопы могут быть определены как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы в целом представляют собой подмножество структурных эпитопов и имеют те остатки, которые осуществляют непосредственный вклад в аффинность взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными, то есть состоять из нелинейных аминокислот. В определенных вариантах осуществления эпитопы могут включать детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и, в определенных вариантах осуществления, могут иметь конкретные характеристики трехмерной структурны и/или конкретные зарядовые характеристики.

Термин "перекрестно конкурирует", как используют в настоящем описании, обозначает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с антигеном и ингибирует или блокирует связывание другого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Термин также включает конкуренцию между двумя антителами в обеих ориентациях, т.е. первое антитело, которое связывает и блокирует связывание второго антитела, и наоборот. В определенных вариантах осуществления первое антитело и второе антитело могут связываться с одним и тем же эпитопом. Альтернативно, первое и второе антитела могут связываться с различными, но перекрывающимися эпитопами так, что связывание одного ингибирует или блокирует связывание второго антитела, например, через стерическое затруднение. Перекрестную конкуренцию между антителами можно измерять известными в данной области способами, например, посредством анализа интерферометрии биослоев без меток в реальном времени. Перекрестная конкуренция между двумя антителами может выражаться в связывании второго антитела, которое меньше,

чем фоновый сигнал, из-за связывания с самим собой (где первое и второе антитела представляют собой одно и то же антитело). Перекрестную конкуренцию между 2 антителами можно выражать, например, в виде % связывания второго антитела, который меньше базового уровня фонового связывания с самим собой (где первое и второе антитела представляют собой одно и то же антитело).

Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный" в отношении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента, указывает на то, что при оптимальном выравнивании с подходящими нуклеотидными инсерциями или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной нитью), имеет место идентичность нуклеотидных последовательностей в по меньшей мере приблизительно 90% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95, 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований, как измеряют с помощью любого общеизвестного алгоритма для идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как рассмотрено далее. Молекула нуклеиновой кислоты, обладающая существенной идентичностью с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты может, в определенных случаях, кодировать полипептид, которые имеет такую же или по существу схожую аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

В применении к полипептидам, термин "существенное сходство" или "по существу схожий" обозначает, что две пептидные последовательности, когда выровнены оптимально, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием весов пропусков по умолчанию, обладают по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей, даже более предпочтительно по меньшей мере 95, 98 или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительно, положения остатков, которые не идентичны, различаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой ту, в которой аминокислотный остаток заменяют на другой аминокислотный остаток, имеющий боковую цепь (группу R) со схожими химическими свойствами (например, заряд или гидрофобность). В целом, консервативная аминокислотная замена по существу не меняет функциональные свойства белка. В случаях, когда две или больше аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент или степень сходства можно корректировать в большую сторону для того, чтобы вносить поправки на консервативную природу замены. Средства внесения таких поправок хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331, которая включена в настоящее описание посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со схожими химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат и 7) серасодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных аминокислотных замен представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативная замена представляет собой любое изменение, которое имеет положительное значение в логарифмической вероятностной матрице PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443 45, включенной в настоящее описание посредством ссылки. "Умеренно консервативная" замена представляет собой любую замену, которая имеет неотрицательное значение в логарифмической вероятностной матрице PAM250.

Сходство последовательностей для полипептидов обычно измеряют с использованием программного обеспечения анализа последовательностей. Программное обеспечение анализа белков сопоставляет схожие последовательности с использованием мер сходства, присваиваемых различным заменам, делециям и другим модификациям, в том числе консервативным аминокислотным заменам. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как GAP и BESTFIT, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для того, чтобы определять гомологию последовательностей или идентичность последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды, от различных видов организмов или между белком дикого типа и его мутеином. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с использованием FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендованными параметрами; программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) предоставляет выравнивания и процент идентичности последовательностей областей с наилучшим перекрытием между запрашиваемыми и искомыми последовательностями (Pearson (2000), выше). Другой предпочтительный алгоритм для сравнения последовательности по изобретению с базой данных, содержащей большое число последовательностей от различных организмов, реализован в компьютерной программе BLAST, в частности BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 и (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки.

Под фразой "терапевтически эффективное количество" понимают количество, которое вызывает желаемый эффект, ради которого его вводят. Точное количество зависит от цели лечения, и его определит специалист в данной области с использованием известных способов (см., например, Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding).

Как используют в настоящем описании, термин "субъект" относится к животному, предпочтительно млекопитающему, более предпочтительно к человеку, нуждающемуся в улучшении, предотвращении и/или лечении C5-ассоциированного заболевания или нарушения, такого как атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS) или пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH). Термин включает человеческих субъектов, которые обладают таким заболеванием или нарушением или имеют риск его наличия.

Как используют в настоящем описании, термин "лечить", "лечащий" или "лечение" относятся к снижению или улучшению тяжести по меньшей мере одного симптома или показания C5-ассоциированного заболевания или нарушения благодаря введению терапевтического средства, такого как антитело по настоящему изобретению, нуждающемуся в этом субъекту. Термин включают ингибирование прогрессирования заболевания или ухудшения симптома/показания. Термин также включают положительный прогноз заболевания, т.е. субъекта можно освобождать от заболевания или он может иметь уменьшенное заболевание при введении терапевтического средства, такого как антитело по настоящему изобретению. Терапевтическое средство можно вводить субъекту в терапевтической дозе.

Термин "предотвращать", "предотвращающий" или "предотвращение" относятся к ингибированию манифестации C5-ассоциированного заболевания или нарушения или любых симптомов или показаний такого заболевания или нарушения при введении антитела по настоящему изобретению.

Антигенсвязывающие фрагменты антител.

Если конкретно не указано иное, термин "антитело", как используют в настоящем описании, следует понимать как охватывающий молекулы антител, содержащие две тяжелые цепи иммуноглобулинов и две легкие цепи иммуноглобулинов (т.е. "полные молекулы антител"), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Термин "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п., как используют в настоящем описании, включают любой встречаемый в природе, получаемый ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген, чтобы формировать комплекс. Термин "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела", как используют в настоящем описании, относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с белком C5. Фрагмент антитела может содержат фрагмент Fab, фрагмент $F(ab')_2$, фрагмент Fv, фрагмент dAb, фрагмент, содержащий CDR, или выделенную CDR. В определенных вариантах осуществления термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептидному фрагменту полиспецифической антигенсвязывающей молекулы. Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно извлекать, например, из полных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных способов, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные способы генетической инженерии с использованием манипуляций и экспрессии ДНК, которая кодирует вариабельные и (необязательно) константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, в коммерческих источниках, библиотеках ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или ее можно синтезировать. ДНК можно секвенировать и манипулировать ею химически или с использованием способов молекулярной биологии, например, чтобы располагать один или несколько вариабельных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или вводить кодоны, создавать остатки цистеина, модифицировать, добавлять или удалять аминокислоты и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты $F(ab')_2$; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3) или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленными доменами, химерные антитела, антитела с пересаженными CDR, диатела, триатела, тетратела, миниантитела, нанотела (например, одновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), небольшие модульные иммунофармацевтические средства (SMIP) и вариабельные домены акулы IgNAR, также охвачены выражением "антигенсвязывающий фрагмент", как используют в настоящем описании.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может быть любого размера или аминокислотного состава и в целом содержит по меньшей мере одну CDR, которая находится смежно с или в рамке с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен $V_H$, связанный с доменом $V_L$, домены $V_H$ и $V_L$ можно располагать друг относительно друга в любом подходящем расположении. Например, вариабельная область может быть димерной и содержать димеры $V_H$-$V_H$, $V_H$-$V_L$ или $V_L$-$V_L$. Альтернативно антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен $V_H$ или $V_L$.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие образцовые конфигурации вариабельных и константных доме-

нов, которые можно найти в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (i) $V_H$-$C_H1$; (ii) $V_H$-$C_H2$; (iii) $V_H$-$C_H3$; (iv) $V_H$-$C_H1$-$C_H2$; (v) $V_H$-$C_H1$-$C_H2$-$C_H3$; (vi) $V_H$-$C_H2$-$C_H3$; (vii) $V_H$-$C_L$; (viii) $V_L$-$C_H1$; (ix) $V_L$-$C_H2$; (x) $V_L$-$C_H3$; (xi) $V_L$-$C_H1$-$C_H2$; (xii) $V_L$-$C_H1$-$C_H2$-$C_H3$; (xiii) $V_L$-$C_H2$-$C_H3$; и (xiv) $V_L$-$C_L$. В любой конфигурации вариабельных и константных доменов, в том числе любых образцовых конфигурациях, перечисленных выше, вариабельные и константные домены можно или непосредственно связывать друг с другом или можно связывать с помощью полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, что ведет к гибкой или полугибкой связи между смежными вариабельными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) из любых конфигураций вариабельных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами $V_H$ или $V_L$ (например, с помощью дисульфидной связи(ей)).

Как и в случае полных молекул антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или полиспецифическими (например, биспецифическими). Полиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере два различных вариабельных домена, где каждый вариабельный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с отличающимся эпитопом на одном и том же антигене. Полиспецифическое антитело в любом формате, в том числе образцовые биспецифические форматы антител, раскрытые в настоящем описании, можно адаптировать для использования в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с использованием стандартных способов, доступных в данной области.

Получение антител человека.

Способы создания антител человека у трансгенных мышей известны в данной области. Любые такие известные способы можно использовать в контексте настоящего изобретения для того, чтобы получать антитела человека, которые специфически связываются с белком C5.

Иммуноген, содержащий любое одно из следующего, можно использовать для того, чтобы создавать антитела к белку C5. В определенных вариантах осуществления антитела по изобретению получают от мышей, иммунизированных полноразмерным нативным белком C5 (см., например, номер доступа Genbank NP_001726.2) (SEQ ID NO: 355) или ДНК, кодирующей белок или его фрагмент. Альтернативно, белок или его фрагмент можно получать с использованием стандартных биохимических способов и модифицировать и использовать в качестве иммуногена. В определенных вариантах осуществления иммуноген представляет собой фрагмент белка C5, который находится в пределах аминокислотных остатков 19-1676 в SEQ ID NO: 355.

В некоторых вариантах осуществления иммуноген может представлять собой рекомбинантный белок C5 или его фрагмент, который экспрессируют в E. coli или любых других эукариотических клетках или клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомяка (CHO).

Используя технологию VELOCIMMUNE® (см., например, US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любой другой известный способ создания моноклональных антител, изначально выделяют высокоаффинные химерные антитела к C5, имеющие вариабельную область человека и константную область мыши. Технология VELOCIMMUNE® включает создание трансгенной мыши, имеющей геном, который содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепи человека, функционально связанные с эндогенными локусами константных областей мыши так, что мышь продуцирует антитело, содержащее вариабельную область человека и константную область мыши, в ответ на антигенную стимуляцию. ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелых и легких цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей константные области тяжелых и легких цепей человека. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способно экспрессировать антитело полностью человека.

В целом, мышь VELOCIMMUNE® стимулируют антигеном, представляющим интерес, и у мышей получают лимфатические клетки (такие как B-клетки), которые экспрессируют антитела. Лимфатические клетки можно сливать с линией миеломных клеток для того, чтобы получать бессмертные гибридомные клеточные линии, и осуществляют скрининг и отбор таких гибридомных клеточных линий для того, чтобы идентифицировать гибридомные клеточные линии, которые продуцируют антитела со специфичностью к антигену, представляющему интерес. ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи, можно выделять и связывать с желаемыми изотипическими константными областями тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела можно получать в клетке, такой как клетка CHO. Альтернативно, ДНК, кодирующую антиген-специфические химерные антитела или вариабельные домены легких и тяжелых цепей, можно выделять непосредственно из антиген-специфических лимфоцитов.

Изначально выделяют высокоаффинные химерные антитела, имеющие вариабельную область человека и константную область мыши. Как в экспериментальном разделе далее, определят характеристики антител и отбирают их по желательным характеристикам, в том числе аффинности, избирательности, эпитопу и т.д. Константные области мыши заменяют на желаемую константную область человека для того, чтобы создавать антитело полностью человека по изобретению, например, дикого типа или моди-

фицированное IgG1 или IgG4. Хотя выбранная константная область может варьировать в соответствии с конкретным использованием, характеристики высокоаффинного связывания антигенов и специфичности к мишени присутствуют в вариабельной области.

Биоэквиваленты.

Антитела против C5 и фрагменты антител по настоящему изобретению охватывают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые варьируют относительно таковых у описанных антител, но сохраняют способность к связыванию белка C5. Такие вариантные антитела и фрагменты антител содержат одно или несколько добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с родительской последовательностью, чтобы проявлять биологическую активность, которая по существу эквивалента таковой у описанных антител. Аналогичным образом, последовательности ДНК, кодирующее антитела, по настоящему изобретению охватывают последовательности, которые содержат одно или несколько добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, которые по существу являются биоэквивалентами антитела или фрагмента антитела по изобретению.

Два антигенсвязывающих белка или антитела считают биоэквивалентами, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, у которых скорость и степень абсорбции не демонстрируют значимых различий при схожих экспериментальных условиях при введении в одинаковой молярной дозе, или однократной дозе или нескольких дозах.

Некоторые антитела следует считать эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и еще можно считать биоэквивалентом, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены на этикетке, не являются важными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при хроническом применении и считаются медицински несущественными для конкретного исследуемого лекарственного продукта.

В одном из вариантов осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентами, если нет клинически значимых различий в их безопасности, чистоте или активности.

В одном из вариантов осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентами, если пациента можно переключать один или несколько раз между эталонным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого увеличения риска нежелательных эффектов, в том числе клинически значимого изменения иммуногенности или сниженной эффективности, по сравнению с продолжением терапии без такого переключения.

В одном из вариантов осуществления два антигенсвязывающих белка представляют собой биоэквиваленты, если оба они действуют по общему механизму или механизмам действия для условия или условий применения, до такой степени, в которой такие механизмы известны.

Биоэквивалентность можно демонстрировать способами in vivo и/или in vitro. Меры биоэквивалентности включают, например, (a) тест in vivo у человека или других млекопитающих, в котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости в качестве функции времени; (b) тест in vitro, который обладает корреляцией с данными о биодоступности у человека in vivo и обоснованной предсказательной способностью в их отношении; (c) тест in vivo у человека или других млекопитающих, в котором подходящий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют в качестве функции времени; и (d) строго контролируемое клиническое исследование, в котором устанавливают безопасность, эффект или биодоступность или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антител по изобретению можно конструировать, например, создавая различные замены остатков или последовательностей или удаляя концевые или внутренние остатки или последовательности, не необходимые для биологической активности. Например, остатки цистеина, которые не важны для биологической активности, можно удалять или заменять на другие аминокислоты для того, чтобы предотвращать формирование не необходимых или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах, биоэквивалентные антитела могут включать варианты антител, которые содержат изменения аминокислот, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые элиминируют или устраняют гликозилирование.

Антитела против C5, содержащие варианты Fc.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения, предусмотрены антитела против C5, которые содержат домен Fc, содержащий одну или несколько мутаций, которые усиливают или уменьшают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Например, настоящее изобретение включает антитела против C5, содержащие мутацию в области $C_H2$ или $C_H3$ домена Fc, где мутация(и) увеличивает аффинность домена Fc к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH находится в диапазоне приблизительно от 5,5 приблизительно до 6,0). Такие мутации могут вести к увеличению времени полужизни антитела в сыворотке при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например,

L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном из вариантов осуществления модификация содержит модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T, и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). В еще одном другом варианте осуществления модификация содержит модификацию 265A (например, D265A) и/или 297A (например, N297A).

Например, настоящее изобретение включает антитела против C5, содержащие домен Fc, содержащий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H);

376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации мутаций вышеуказанного домена Fc и других мутаций в вариабельных доменах антител, раскрытые в настоящем описании, предусмотрены в объеме настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также относится к антителам против C5, содержащим химерную константную область ($C_H$) тяжелой цепи, где химерная область $C_H$ содержит сегменты, полученные из областей $C_H$ больше чем одного изотипа иммуноглобулинов. Например, антитела по изобретению могут содержать химерную область $C_H$, содержащую частичный или полный домен $C_H2$, полученный из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации с частичным или полным доменом $C_H3$, полученным из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления, антитела по изобретению содержат химерную область $C_H$, имеющую химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать аминокислотную последовательность "верхнего шарнира" (аминокислотные остатки из положений с 216 до 227 в соответствии с нумерацией EU), полученную из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации с последовательностью "нижнего шарнира" (аминокислотные остатки из положений с 228 до 236 в соответствии с нумерацией EU), полученной из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления, химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, полученные из верхнего шарнира IgG1 человека или IgG4 человека, и аминокислотные остатки, полученные из нижнего шарнира IgG2 человека. Антитело, содержащее химерную область $C_H$, как раскрыто в настоящем описании, в определенных вариантах осуществления может проявлять модифицированные эффекторные функции Fc, не оказывая нежелательного влияния на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, публикацию патентной заявки США 2014/0243504, раскрытие которой, таким образом, включено посредством ссылки в полном объеме).

Биологические характеристики антител.

В целом, антитела по настоящему изобретению функционируют посредством связывания с белком C5 и предотвращения его расщепления на C5a и C5b. Например, настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают белок C5 (например, при 25°C или при 37°C) с $K_D$ меньше чем 9 нМ, как измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем описании. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают C5 с $K_D$ приблизительно меньше чем 9 нМ, приблизительно меньше чем 5 нМ, приблизительно меньше чем 2 нМ, приблизительно меньше чем 1 нМ, приблизительно меньше чем 500 пМ, меньше чем 250 пМ или меньше чем 100 пМ, как измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем описании, или по существу схожего анализа.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают белок C5 человека с диссоциационным временем полужизни ($t_{1/2}$) больше чем приблизительно 2 мин, как измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25°C, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 4 в настоящем описании, или по существу схожего анализа. В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связывают белок C5 с $t_{1/2}$ больше чем приблизительно 5 мин, больше чем приблизительно 10 мин, больше чем приблизительно 30 мин, больше чем приблизительно 50 мин, больше чем приблизительно 100 мин, больше чем приблизительно 150 мин, больше чем приблизительно 200 мин или больше чем приблизительно 250 мин, как измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25°C, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем описании (например, формат с захватом mAb или с захватом антигена), или по существу схожего анализа.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают белок C5 человека с диссоциационным временем полужизни ($t_{1/2}$) больше чем приблизительно 1,5 мин, как измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса при 37°C, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 4 в настоящем описании, или по существу схожего анализа. В определенных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связывают белок C5 с $t_{1/2}$ больше чем приблизительно 2 мин, больше чем приблизительно 5 мин, больше чем приблизительно 10 мин, больше чем приблизительно 25 мин, больше чем приблизительно 50 мин, больше чем приблизительно 100 мин, больше чем приблизительно 150 мин или больше чем приблизительно 200 мин, как измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса при 37°C, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем описании (например, формат с захватом mAb или с захватом антигена), или по существу схожего анализа.

Настоящее изобретение также относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые связывают белок C5 обезьяны (например, при 25°C или при 37°C) с $K_D$ меньше чем 120 нМ, как измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем описании. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают C5 обезьяны с $K_D$ приблизительно меньше чем 120 нМ, приблизительно меньше чем 100 нМ, приблизительно меньше чем 50 нМ, приблизительно меньше чем 25 нМ, приблизительно меньше чем 10 нМ, приблизительно меньше чем 5 нМ, приблизительно меньше чем 1 нМ, приблизительно меньше чем 500 пМ или меньше чем 250 пМ, как измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем описании, или по существу схожего анализа.

Настоящее изобретение также относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые связывают модифицированный белок C5 человека с заменой R885H (примером служит SEQ ID NO: 356) с $K_D$ меньше чем 70 нМ, как измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем описании. Варианты C5 показали слабый ответ на антитела против C5, ранее раскрытые в данной области (например, Nishimura et al 2014, New Engl. J. Med. 370: 632-639). В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают модифицированный C5 человека с $K_D$ приблизительно меньше чем 65 нМ, приблизительно меньше чем 50 нМ, приблизительно меньше чем 20 нМ, приблизительно меньше чем 10 нМ, приблизительно меньше чем 5 нМ, приблизительно меньше чем 3 нМ или меньше чем 2 нМ, как измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем описании, или по существу схожего анализа.

Настоящее изобретение также относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые связывают модифицированный белок C5 человека с заменой R885C (примером служит SEQ ID NO: 357) с $K_D$ меньше чем 160 нМ, как измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем описании. Варианты C5 показали слабый ответ на антитела против C5, ранее раскрытые в данной области (например, Nishimura et al 2014, New Engl. J. Med. 370: 632-639). В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают модифицированный C5 человека с $K_D$ приблизительно меньше чем 150 нМ, приблизительно меньше чем 100 нМ, приблизительно меньше чем 50 нМ, приблизительно меньше чем 20 нМ, приблизительно меньше чем 10 нМ, приблизительно меньше чем 5 нМ или меньше чем 2 нМ, как измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем описании, или по существу схожего анализа.

Настоящее изобретение также относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые ингибируют комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) с $IC_{50}$ меньше чем 10 нМ, как измеряют посредством анализа люминесценции, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 6 в настоящем описании. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты ингибируют CDC с $IC_{50}$ приблизительно меньше чем 5 нМ, приблизительно меньше чем 3,5 нМ или приблизительно меньше чем 2 нМ, как измеряют посредством анализа люминесценции B-клеток, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 6 в настоящем описании, или по существу схожего анализа.

Настоящее изобретение также относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам, которые блокируют опосредованный C5 человека классический путь (CP) гемолиз больше чем на 94% и с $IC_{50}$ меньше чем 6 нМ, как измеряют посредством анализа CP гемолиза, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 8 в настоящем описании. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют CP гемолиз с $IC_{50}$ приблизительно меньше чем 6 нМ, приблизительно меньше чем 5 нМ, приблизительно меньше чем 4 нМ, приблизительно меньше чем 3 нМ или приблизительно меньше чем 2 нМ, как измеряют посредством анализа CP гемолиза, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 8 в настоящем описании, или по

существу схожего анализа.

Настоящее изобретение также относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам, которые блокируют опосредованный С5 человека альтернативный путь (АР) гемолиза больше чем на 70% и с $IC_{50}$ меньше чем 165 нМ, как измеряют посредством анализа АР гемолиза, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 8 в настоящем описании. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют АР гемолиз с $IC_{50}$ приблизительно меньше чем 160 нМ, приблизительно меньше чем 150 нМ, приблизительно меньше чем 100 нМ, приблизительно меньше чем 50 нМ или приблизительно меньше чем 20 нМ, как измеряют посредством анализа АР гемолиза, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 8 в настоящем описании, или по существу схожего анализа.

Настоящее изобретение также относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам, которые блокируют опосредованный С5 африканской зеленой мартышки классический путь (СР) гемолиза больше чем на 40% и с $IC_{50}$ меньше чем 185 нМ, как измеряют посредством анализа СР гемолиза, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 8 в настоящем описании. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют СР гемолиз с $IC_{50}$ приблизительно меньше чем 180 нМ, приблизительно меньше чем 150 нМ, приблизительно меньше чем 100 нМ, приблизительно меньше чем 75 нМ или приблизительно меньше чем 50 нМ, как измеряют посредством анализа СР гемолиза, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 8 в настоящем описании, или по существу схожего анализа.

Настоящее изобретение также относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам, которые блокируют опосредованный С5 африканской зеленой мартышки альтернативный путь (АР) гемолиза с $IC_{50}$ меньше чем 235 нМ, как измеряют посредством анализа АР гемолиза, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 8 в настоящем описании. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют АР гемолиз с $IC_{50}$ приблизительно меньше чем 200 нМ, приблизительно меньше чем 150 нМ, приблизительно меньше чем 100 нМ, приблизительно меньше чем 50 нМ или приблизительно меньше чем 20 нМ, как измеряют посредством анализа АР гемолиза, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 8 в настоящем описании, или по существу схожего анализа.

Настоящее изобретение также относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам, которые блокируют больше чем 90% опосредованного С5 яванского макака классического пути (СР) гемолиза с $IC_{50}$ меньше чем 145 нМ, как измеряют посредством анализа СР гемолиза, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 8 в настоящем описании. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют СР гемолиз с $IC_{50}$ приблизительно меньше чем 140 нМ, приблизительно меньше чем 120 нМ, приблизительно меньше чем 100 нМ, приблизительно меньше чем 75 нМ или приблизительно меньше чем 50 нМ, как измеряют посредством анализа СР гемолиза, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 8 в настоящем описании, или по существу схожего анализа.

Настоящее изобретение также относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам, которые блокируют опосредованный С5 яванского макака альтернативный путь (АР) гемолиза с $IC_{50}$ меньше чем 30 нМ, как измеряют посредством анализа АР гемолиза, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 8 в настоящем описании. В определенных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют АР гемолиз с $IC_{50}$ приблизительно меньше чем 25 нМ, приблизительно меньше чем 20 нМ, приблизительно меньше чем 10 нМ, приблизительно меньше чем 5 нМ или приблизительно меньше чем 2 нМ, как измеряют посредством анализа АР гемолиза, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 8 в настоящем описании, или по существу схожего анализа.

Настоящее изобретение также относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам, которые демонстрируют усовершенствованные фармакокинетические (PK) и фармакодинамические (PD) свойства по сравнению с антителами против С5 в данной области. Антитела против С5 по настоящему изобретению демонстрируют меньшую подверженность опосредованному мишенью клиренсу при введении, как показано в примерах 9 и 10 в настоящем описании. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение включает антитела против С5 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые демонстрируют концентрации в сыворотке в течение продолжительных периодов, например, больше чем 20 суток, больше чем 25 суток, больше чем 30 суток, больше чем 35 суток, больше чем 40 суток, больше чем 45 суток, больше чем 50 суток, больше чем 55 суток или больше чем 60 суток, как описано в примерах 9 и 10, в настоящем описании. В определенных вариантах осуществления антитела против С5 по настоящему изобретению демонстрируют увеличенное время полужизни в сыворотке больше чем 10 суток, по сравнению с антителами против С5 в данной области.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела против С5 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые обладают высокой аффинностью к С5 человека (например, $K_D$ меньше чем 0,3 нМ) и более низким клиренсом (например, увеличенное время полужизни в сыворотке, усовершенствованная фармакодинамическая активность в течение большего числа суток,

чем ранее известные антитела против C5). Такие антитела по настоящему изобретению можно полезно применять при менее частом дозировании у субъекта с C5-ассоциированным заболеванием или нарушением.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение предусматривает выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком C5, где антитело или его фрагмент проявляют одну или несколько следующих характеристик: (a) представляет собой моноклональное антитело полностью человека; (b) связывается с C5 человека с константой диссоциации ($K_D$) меньше чем 0,9 нМ при 25°C, как измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (c) связывается с C5 человека с $K_D$ меньше чем 0,3 нМ при 37°C, как измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (d) имеет концентрацию в сыворотке больше чем 10 мкг/мл до суток 70 при введении яванскому макаку; (e) блокирует CP и AP гемолиз до суток 35 при введении яванскому макаку, как измеряют в анализе гемолиза ex vivo; (f) имеет время полужизни в сыворотке больше чем 10 суток у яванского макака; (g) имеет концентрацию в сыворотке больше чем 10 мкг/мл до суток 40 при введении C5-гуманизированным мышам; (h) блокирует CP гемолиз до суток 30 при введении C5-гуманизированным мышам, как измеряют в анализе гемолиза ex vivo; и (i) имеет время полужизни в сыворотке больше чем 10 суток у C5-гуманизированных мышей.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение предусматривает выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком C5, где антитело или его фрагмент демонстрируют одну или несколько следующих характеристик: (a) представляет собой моноклональное антитело полностью человека; (b) связывается с C5 человека с константой диссоциации ($K_D$) меньше чем 0,9 нМ при 25°C, как измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (c) связывается с C5 человека с $K_D$ меньше чем 0,3 нМ при 37°C, как измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (d) связывается с C5 обезьяны с $K_D$ меньше чем 65 нМ, как измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (e) связывается с вариантом C5 человека R885H (SEQ ID NO: 356) с $K_D$ меньше чем 0,5 нМ, как измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (f) связывается с вариантом C5 человека R885C (SEQ ID NO: 357) с $K_D$ меньше чем 0,5 нМ, как измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (g) блокирует опосредованный C5 человека классический путь (CP) гемолиза больше чем на 95% и с $IC_{50}$ меньше чем 6 нМ, как измеряют в анализе CP гемолиза; (h) блокирует опосредованный C5 человека альтернативный путь (AP) гемолиза больше чем на 70% и с $IC_{50}$ меньше чем 165 нМ, как измеряют анализе AP гемолиза; (i) ингибирует опосредованный C5 африканской зеленой мартышки CP гемолиз с $IC_{50}$ меньше чем 185 нМ, как измеряют в анализе CP гемолиза; (j) ингибирует опосредованный C5 африканской зеленой мартышки AP гемолиз с $IC_{50}$ меньше чем 235 нМ, как измеряют анализе AP гемолиза; (k) ингибирует опосредованный C5 яванского макака CP гемолиз с $IC_{50}$ меньше чем 145 нМ, как измеряют в анализе CP гемолиза; и (l) ингибирует опосредованный C5 яванского макака AP гемолиз с $IC_{50}$ меньше чем 30 нМ, как измеряют анализе AP гемолиза.

Антитела по настоящему изобретению могут обладать одной или несколькими из указанных выше биологических характеристик или любыми их сочетаниями. Другие биологические характеристики антител по настоящему изобретению будут видны специалисту в данной области при просмотре настоящего раскрытия, включая рабочие примеры в настоящем описании.

Картирование эпитопов и связанные технологии.

Настоящее изобретение включает антитела против C5, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, встречающимися в одной или нескольких областях молекулы белка C5, включая α полипептид и β полипептид. Эпитоп, с которым связываются антитела, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или больше (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше) аминокислот, расположенных в любом из указанных выше доменов молекулы белка C5 (например, линейный эпитоп в домене). Альтернативно, эпитоп может состоять из множества не непрерывных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), которые расположены в любом или обоих указанных выше доменах молекулы белка (например, конформационный эпитоп).

Различные способы, известные специалистам в данной области, можно использовать для того, чтобы определять, "взаимодействует ли антитело с одной или несколькими аминокислотами" в полипептиде или белке. Образцовые способы включают, например, стандартные перекрестные конкурентные анализы, такие как те, что описаны в Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Другие способы включают анализ сканирующего аланином мутагенеза, анализ пептидидного блоттинга (Reineke (2004) Methods Mol. Biol. 248: 443-63), кристаллографические исследования при пептидном анализе расщепления и ЯМР анализ. Кроме того, можно использовать такие способы, как вырезание эпитопов, извлечение эпитопов и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) Prot. Sci. 9: 487-496). Другой способ, который можно использовать для того, чтобы идентифицировать аминокислоты в полипептиде, с которыми антитело взаимодействует, представляет собой водород-дейтериевый обмен, обнаруживаемый посредством масс-спектрометрии. Вообще говоря, водород-дейтериевый обмен способ включает мечение белка, представляющего интерес, дейтерием, после чего следует связывание антитела

с меченным дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду и подлежащие обмену протоны в аминокислотах, которые защищены антительным комплексом, подвергаются обратному обмену дейтерия на водород с более низкой скоростью, чем подлежащие обмену протоны в аминокислотах, которые не являются частью области контакта. Как результат, аминокислоты, которые образуют часть области контакта белка/антитела, могут сохранять дейтерий и, следовательно, демонстрировать относительно более высокую массу по сравнению с аминокислотами, не включенными в область контакта. После диссоциации антитела, целевой белок подвергают протеазному расщеплению и масс-спектрометрическому анализу, тем самым выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми антитело взаимодействует. См., например, Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267: 252-259; Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73: 256A-265A.

Термин "эпитоп" относится к месту на антигене, на которое отвечают В-и/или Т-клетки. В-клеточные эпитопы можно формировать из непрерывных аминокислот или не непрерывных аминокислот, которые сближены за счет третичной укладки белка. Эпитопы, формируемые из непрерывных аминокислот, обычно сохраняются под воздействием денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образуемые посредством третичной укладки, обычно утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно содержит по меньшей мере 3 и более обычно по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Профилирование с помощью модификаций (MAP), также известное как профилирование антител на основе структуры антигена (ASAP), представляет собой способ классификации большого числа моноклональных антител (mAb), обнаруживаемых для одного и того же антигена, в соответствии со сходствами профиля связывания каждого антитела с поверхностями химически или ферментативно модифицированных антигенов (см. US 2004/0101920, в настоящем описании конкретно включенную посредством ссылки в полном объеме). Каждая категория может отражать уникальный эпитоп, который или отчетливо отличается от эпитопа, представляемого другой категорией, или частично перекрывается с ним. Эта технология делает возможной быструю фильтрацию генетически идентичных антител так, что определение характеристик можно сосредоточить на генетически различных антителах. Когда применят к скринингу гибридом, MAP может облегчать идентификацию редких клонов гибридом, которые продуцируют mAb, обладающие желаемыми характеристиками. MAP можно использовать для сортировки антител по изобретению по группам антител, связывающих различные эпитопы.

В определенных вариантах осуществления антитела против C5 или их антигенсвязывающие фрагменты связывают эпитоп в любой одной или нескольких из областей, примеры которых приведены в белке C5, или в естественной форме, как показано на примере в SEQ ID NO: 355, или рекомбинантно полученной, или с его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению связываются с областью, содержащей одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков 19-1676 белка C5 человека.

В определенных вариантах осуществления антитела по изобретению, взаимодействуют с по меньшей мере одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных остатков в диапазоне от приблизительно положения 19 приблизительно до положения 750; или аминокислотных остатков в диапазоне от приблизительно положения 751 приблизительно до положения 1676 в SEQ ID NO: 355.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение включает антитела против C5 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые взаимодействуют с одним или несколькими эпитопами, встречающимися в α и/или β цепи C5 (SEQ ID NO: 359). Эпитоп(ы) может состоять из одной или нескольких непрерывных последовательностей из 3 или больше (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше) аминокислот, расположенных в α цепи и/или β цепи C5. Альтернативно, эпитоп может состоять из множества не непрерывных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных в C5. Как показано в примере 11 в настоящем описании, эпитоп C5, с которым взаимодействует образцовое антитело по изобретению H4H12166P, определяют с помощью: (i) аминокислотной последовательности NMATGMDSW (SEQ ID NO: 360), которая соответствует аминокислотам с 591 до 599, содержащимся в β цепи SEQ ID NO: 359; и (ii) аминокислотной последовательности WEVHLVPRRKQLQFALPDSL (SEQ ID NO: 361), которая соответствует аминокислотам с 775 до 794, содержащимся в а цепи SEQ ID NO: 359. Соответственно, настоящее изобретение включает антитела против C5, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, содержащимися в области, состоящей из (i) аминокислотной последовательности NMATGMDSW (SEQ ID NO: 360), которая соответствует аминокислотам с 591 до 599 из SEQ ID NO: 359; и (ii) аминокислотной последовательности WEVHLVPRRKQLQFALPDSL (SEQ ID NO: 361), которая соответствует аминокислотам с 775 до 794 из SEQ ID NO: 359.

Настоящее изобретение включает антитела против C5, которые связываются с тем же эпитопом, или частью эпитопа, что и любые из специфических образцовых антител, перечисленных в табл. 1. Аналогичным образом, настоящее изобретение также относится к антителам против C5, которые конкурируют за связывание с белком C5 или его фрагментом с любым из специфических образцовых антител,

перечисленных в табл. 1. Например, настоящее изобретение включает антитела против C5, которые перекрестно конкурируют за связывание с белком C5 с одним или несколькими антителами, перечисленными в табл. 1.

Можно легко определять, связывается ли антитело с тем же эпитопом, или конкурирует за связывание, с эталонным антителом против C5 с использованием стандартных известных в данной области способов. Например, для того, чтобы определять если тестовое антитело связывается с тем же эпитопом, что и эталонное антитело против C5 по изобретению, эталонному антителу позволяют связываться с белком или пептидом C5 при насыщающих условиях. Затем оценивают способность тестового антитела связываться с молекулой белка C5. Если тестовое антитело способно связываться с C5 после насыщающего связывания с эталонным антителом против C5, то можно заключить, что тестовое антитело связывается с другим эпитопом, нежели эталонное антитело против C5. С другой стороны, если тестовое антитело не способно связываться с белком C5 после насыщающего связывания с эталонным антителом против C5, то тестовое антитело может связываться с тем же эпитопом, что эпитоп, связываемый эталонным антителом против C5 по изобретению.

Для того чтобы определять, если антитело конкурирует за связывание с эталонным антителом против C5, описанный выше способ связывания осуществляют в двух ориентациях: в первой ориентации эталонному антителу позволяют связываться с белком C5 при насыщающих условиях, после чего следует оценка связывания тестового антитела с молекулой C5. Во второй ориентации тестовому антителу позволяют связываться с молекулой C5 при насыщающих условиях, после чего следует оценка связывания эталонного антитела с молекулой C5. Если в обеих ориентациях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой C5, то заключают, что тестовое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с C5. Специалист в данной области примет во внимание, что антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, может не обязательно связываться с идентичным эпитопом, как эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела посредством связывания перекрывающегося или смежного эпитопа.

Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждое конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. То есть, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратных избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75, 90 или даже 99%, как измеряют в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990 50:1495-1502). Альтернативно, два антитела имеют один и тот же эпитоп, если по существу все аминокислотные мутации в антигене, которые снижают или устраняют связывание с одним антителом, снижают или устраняют связывание с другим. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые аминокислотные мутации, которые снижают или устраняют связывание с одним антителом, снижают или устраняют связывание с другим.

Затем можно осуществлять дополнительные стандартные эксперименты (например, мутации в пептидах и анализы связывания) для того, чтобы подтверждать, обусловлено ли наблюдаемое отсутствие связывания тестового антитела фактически связыванием с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, или если стерическое блокирование (или другой феномен) отвечает за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты этого типа можно осуществлять с использованием ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области.

Иммуноконъюгаты.

Данное изобретение относится к моноклональному антителу человека против C5, конъюгированному с терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгат"), чтобы лечить C5-ассоциированное заболевание или нарушение (например, атипичный гемолитико-уремический синдром). Как используют в настоящем описании, термин "иммуноконъюгат" относится к антителу, которое химически или биологически связывают с радиоактивным средством, цитокином, интерфероном, фрагментом мишени или репортера, ферментом, пептидом или белком или терапевтическим средством. Антитела можно связывать с радиоактивным средством, цитокином, интерфероном, фрагментом мишени или репортера, ферментом, пептидом или терапевтическим средством в любом местоположении вдоль молекулы при условии, что они способны связываться со своей мишенью. Примеры иммуноконъюгатов включают конъюгаты антител и лекарственных средств и слитые белки антитело-токсин. В одном из вариантов осуществления средство может представлять собой второе отличающееся антитело к белку C5. Тип терапевтического фрагмента, который можно конъюгировать с антителом против C5, должен учитывать состояние, подлежащее лечению, и желаемый терапевтический эффект, подлежащий достижению. Примеры подходящих средств для формирования иммуноконъюгатов известны в данной области; см., например, WO 05/103081.

Полиспецифические антитела.

Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или полиспецифическими. Полиспецифические антитела могут обладать специфичностью к различным эпитопам одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены со специфичностью к больше чем одному целевому полипептиду. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244.

Любые полиспецифические антигенсвязывающие молекулы по изобретению или их варианты можно конструировать с использованием стандартных способов молекулярной биологии (например, технология рекомбинантной ДНК и экспрессии белка), как известно специалистам в данной области.

В некоторых вариантах осуществления C5-специфические антитела создают в биспецифическом формате ("биспецифические"), в котором вариабельные области, связывающиеся с различными доменами белка C5, связаны вместе, чтобы придавать двухдоменную специфичность одной связывающей молекуле. Надлежащим образом разработанные биспецифические средства могут усиливать общий ингибирующий белок C5 эффект через увеличение как специфичности, так и авидности связывания. Вариабельные области со специфичностью к индивидуальным доменам, (например, сегменты N-концевого домена), или которые могут связываться с различными областями в одном домене, образуют пары на структурном остове, который позволяет каждой области связываться одновременно с отдельными эпитопами или с различными областями в одном домене. В одном из примеров для биспецифического средства, вариабельные области тяжелой цепи ($V_H$) из связывающего средства со специфичностью к одному домену рекомбинируют с вариабельными областями легкой цепи ($V_L$) из серии связывающих средств со специфичностью ко второму домену для того, чтобы идентифицировать не когнатных $V_L$ партнеров, которые могут образовывать пары с исходной $V_H$ без нарушения исходной специфичности для этой $V_H$. Таким образом, один сегмент $V_L$ (например, $V_L1$) можно комбинировать с двумя различными доменами $V_H$ (например, $V_H1$ и $V_H2$) для того, чтобы создавать биспецифическое средство, состоящее из двух связывающих "плеч" ($V_H1$-$V_L1$ и $V_H2$-$V_L1$). Использование одного сегмента $V_L$ снижает сложность системы и, тем самым, упрощает и увеличивает эффективность в процессах клонирования, экспрессии и очистки, используемых для того, чтобы создавать биспецифическое средство (см., например, USSN13/022759 и US2010/0331527).

Альтернативно, антитела, которые связывают больше чем один домен и вторую мишень, такую как, но не ограничиваясь этим, например, второе отличающееся антитело против C5, можно получать в биспецифическом формате с использованием способов, описанных в настоящем описании, или других способов, известных специалистам в данной области. Вариабельные области антител, которые связываются с отличающимися областями, можно связывать вместе с вариабельными областями, которые связываются с релевантными участками, например, на внеклеточном домене C5, чтобы придавать двойную антигенную специфичность одной связывающей молекуле. Надлежащим образом разработанные биспецифические средства с этими свойствами выполняют двойную функцию. Вариабельные области со специфичностью ко внеклеточному домену комбинируют с вариабельной областью со специфичностью к наружному внеклеточному домену и образуют пары на структурном остове, который позволяет каждой вариабельной области связываться с отдельными антигенами.

Образцовый формат биспецифических антител, который можно использовать в контексте настоящего изобретения, включает использование домена $C_H3$ первого иммуноглобулина (Ig) и второго домена $C_H3$ Ig, где первый и второй домены $C_H3$ Ig отличаются друг от друг по меньшей мере одной аминокислотой и где различие по меньшей мере в одну аминокислоту снижает связывание биспецифического антитела с белком A по сравнению с биспецифическим антителом, не имеющим аминокислотного отличия. В одном из вариантов осуществления первый домен $C_H3$ Ig связывает белок A и второй домен $C_H3$ Ig содержит мутацию, которая снижает или устраняет связывание белка A, такую как модификация H95R (по нумерации экзонов IMGT; H435R по нумерации EU). Второй $C_H3$ дополнительно может содержать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F по EU). Дополнительные модификации, которые можно найти во втором $C_H3$, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I по EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU) в случае антител IgG4. Вариации биспецифического формата антител, которые описаны выше, предусмотрены в объеме настоящего изобретения.

Другие образцовые биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают, без ограничения, например, основанные на scFv или биспецифические форматы диател, слитые конструкции IgG-scFv, Ig с двойным вариабельным доменом (DVD), квадрому, выступы-во-впадины, обыкновенную легкую цепь (например, обыкновенную легкую цепь с выступами-во-впадины и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, лейциновую молнию, Duobody, IgG1/IgG2, IgG с двойного действия Fab (DAF) и биспецифические форматы Mab2 (обзор вышеуказанных форматов см., например, в Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11 и цитируемых в них ссылках). Биспецифические антитела также можно конструировать с использованием конъюгации пептидов/нуклеиновых кислот, например, где не природные аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью используют для того, чтобы создавать сайт-специфические конъюгаты антитело-олигонуклеотид, которые затем самособираются в мультимерные комплексы с определенными составом, валентностью и геометрией. (См., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Терапевтическое введение и составы.

Изобретение относится к терапевтическим композициям, содержащим антитела против C5 или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению. Терапевтические композиции в соответ-

ствии с изобретением следует вводить с подходящими носителями, эксципиентами и другими средствами, которые включают в составы для обеспечения усовершенствованного переноса, доставки, переносимости и т.п. Множество подходящих составов можно найти в справочнике, известном всем фармацевтическим химикам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, жиры, липидсодержащие (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™), ДНК конъюгаты, безводные абсорбционные пасты, эмульсии "масло-вводе" и "вода-в-масле", эмульсии Carbowax (полиэтиленгликоли различных молекулярных масс), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие Carbowax. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Дозу антитела можно варьировать в зависимости от возраста и размеров субъекта, подлежащего введению, целевого заболевания, условий, пути введения и т.п. Когда антитело по настоящему изобретению применяют для лечения заболевания или нарушения у взрослого пациента или для предотвращения такого заболевания, благоприятно вводить антитело по настоящему изобретению, обычно в однократной дозе приблизительно от 0,1 приблизительно до 100 мг/кг массы тела, более предпочтительно приблизительно от 5 приблизительно до 80, приблизительно от 10 приблизительно до 70 или приблизительно от 20 приблизительно до 50 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния, частоту и длительность лечения можно корректировать. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению можно вводить в виде начальной дозы по меньшей мере приблизительно от 0,1 мг приблизительно до 800 мг, приблизительно от 1 приблизительно до 600 мг, приблизительно от 5 приблизительно до 500 мг или приблизительно от 10 приблизительно до 400 мг. В определенных вариантах осуществления за начальной дозой может следовать введение второй или множества последующих доз антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, которое может приблизительно таким же или меньше такового в начальной дозе, где последующие дозы разделяют по меньшей мере 1-3 сутками; по меньшей мере одной неделей, по меньшей мере 2 неделями; по меньшей мере 3 неделями; по меньшей мере 4 неделями; по меньшей мере 5 неделями; по меньшей мере 6 неделями; по меньшей мере 7 неделями; по меньшей мере 8 неделями; по меньшей мере 9 неделями; по меньшей мере 10 неделями; по меньшей мере 12 неделями; или по меньшей мере 14 неделями.

Различные системы доставки известны, и их можно применять для того, чтобы вводить фармацевтическую композицию по изобретению, например, инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, рецептор-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают, но не ограничиваясь этим, внутрикожный, трансдермальный, внутримышечный, интраперитонеальный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и оральный пути. Композицию можно вводить с помощью любого удобного пути, например, посредством инфузии или болюсной инъекции, посредством абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые выстилки (например, слизистая оболочка рта, ректальная и кишечная слизистая и т.д.), и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным. Фармацевтическую композицию также можно доставлять в везикуле, в частности липосоме (см., например, Langer (1990) Science 249:1527-1533).

Использование наночастиц для того, чтобы доставлять антитела по настоящему изобретению, также предусмотрено в настоящем описании. Конъюгированные с антителами наночастицы можно использовать как для терапевтических, так и для диагностических применений. Конъюгированные с антителами наночастицы и способы получения и использования описаны подробно в Arruebo, M., et al. 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" в J. Nanomat., том 2009, ID статьи 439389, 24 страницы, doi: 10,1155/2009/439389), включенной в настоящее описание посредством ссылки. Наночастицы можно разрабатывать и конъюгировать с антителами, содержащимися в фармацевтических композициях для направленного воздействия на клетки. Наночастицы для доставки лекарственных средств также описаны, например, в US 8257740 или US 8246995, каждый включен в настоящее описание в полном объеме.

В определенных ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. В одном из вариантов осуществления можно использовать насос. В другом варианте осуществления можно использовать полимерные материалы. В еще одном другом варианте осуществления, систему с контролируемым высвобождением можно помещать вблизи от мишени композиции, что, таким образом, требует только доли от системной дозы.

Инъецируемые препараты могут включать дозированные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных, внутричерепных, интраперитонеальных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти инъецируемые препараты можно получать с помощью общеизвестных способов. Например, инъецируемые препараты можно получать, например, посредством растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, стандартно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций, имеют место, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства, и т.д., которые можно использовать в комбинации с подходящим солюбили-

зирующим средством, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное средство [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) продукт присоединения гидрогенизированного касторового масла)] и т.д. В качестве масляной среды используют, например, сезамовое масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в комбинации с солюбилизирующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Инъекцией, полученной таким образом, предпочтительно заполняют подходящую ампулу.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно с использованием стандартных иглы и шприца. Кроме того, в отношении подкожной доставки, устройство доставки по типу ручки без труда находит применения для доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Такое устройство доставки по типу ручки может быть повторно используемым или одноразовым. Повторно используемое устройство доставки по типу ручки в целом использует заменяемый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Когда вся фармацевтическая композиция в картридже введена и картридж пуст, пустой картридж можно легко выбрасывать и заменять на новый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Устройство доставки по типу ручки затем можно повторно использовать. В одноразовом устройстве доставки по типу ручки заменяемый картридж отсутствует. Скорее, одноразовое устройство доставки по типу ручки поступает предварительно заполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре в устройстве. Когда фармацевтическая композиция в резервуаре закончилась, выбрасывают устройство целиком.

Многие повторно используемые устройства доставки по типу ручки и автоинъектора находят применения для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Примеры включают, но определенно без ограничения этим, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland), ручку HUMALOG MIX 75/25™, ручку HUMALOG™, ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), ручку BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany), среди прочих. Примеры одноразовых устройств доставки по типу ручки, имеющие применения для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, но определенно без ограничения этим, ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) и ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), среди прочих.

Благоприятно, описанные выше фармацевтические композиции для орального или парентерального использования получают в дозированных формах в стандартной дозе, подобранной так, чтобы соответствовать дозе активных ингредиентов. Такие дозированные формы в стандартной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося антитела в целом составляет приблизительно от 5 приблизительно до 500 мг на дозированную форму в стандартной дозе; в частности, в форме инъекции предпочтительно антитело составляло приблизительно от 5 приблизительно до 300 мг и приблизительно от 10 приблизительно до 300 мг для других дозированных форм.

Терапевтическое использование антител.

Антитела по настоящему изобретению можно использовать для лечения и/или предотвращения заболевания или нарушения или состояния, связанного с C5, и/или для улучшения по меньшей мере одного симптома, связанного с таким заболеванием, нарушением или состоянием. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению можно вводить в терапевтической дозе пациенту с заболеванием или нарушением или состоянием, связанным с C5.

В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению можно использовать при лечении или предотвращении симптома или показания атипичного гемолитико-уремического синдрома (aHUS). Симптомы и показания при aHUS включают, но не ограничиваясь этим, активацию тромбоцитов, гемолиз, системную тромботическую микроангиопатию (формирование сверткров крови в небольших кровеносных сосудах по всему организму), ведущую к инсульту, сердечному приступу, почечной недостаточности и/или гибели, терминльной стадии почечной недостаточности, постоянному повреждению почек, боли в животе, спутанности, отеку, утомлению, тошноте/рвоте, диарее и микроангиопатической анемии.

В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению можно использовать при лечении или предотвращении симптома или показания при пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH). Симптомы и показания при PNH включают, но не ограничиваясь этим, разрушение красных клеток крови, тромбоз (в том числе тромбоз глубоких вен, легочную эмболию), внутрисосудистую гемолитическую анемию, красную окраску мочи, симптомы анемии, такие как усталость, одышка и сердцебиения, боль в животе и затрудненное глотание.

В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению можно использовать для лечения или предотвращения по меньшей мере одного симптома или показания C5-ассоциированного заболевания или нарушения, выбранных из группы, состоящей из неврологических нарушений, почечных нарушений, рассеянного склероза, инсульта, синдрома Гийена-Барре, травматического повреждения головного мозга, болезни Паркинсона, нарушений ненадлежащей или нежелательной активации комплемента, осложнений гемодиализа, сверхострого отторжения аллотрансплантата, отторжения ксенотрансплантата, индуцированной интерлейкином-2 токсичность во время терапии IL-2, воспалительных нарушений, воспаления при аутоиммунных заболеваниях, болезни Крона, респираторного дистресс-синдрома взрослых, термического повреждения, включая ожоги или обморожения, постишемических реперфузионных состояний, инфаркта миокарда, синдрома повышенной проницаемости капилляров, ожирения, диабета, болезни Альцгеймера, шизофрении, инсульта, эпилепсии, атеросклероза, васкулита, буллезного пемфигоида, C3-гломерулопатии, мембранопролиферативного гломерулонефрита, баллонной ангиопластики, постгемодиализного синдрома при сердечно-легочном шунтировании или почечном шунтировании, гемодиализа, почечной ишемии, реперфузии брыжеечной артерии после реконструкции аорты, инфекционного заболевания или сепсиса, нарушений иммунных комплексов и аутоиммунных заболеваний, диабетической нефропатии, синдрома Альпорта, прогрессирующей почечной недостаточности, протеинурических заболеваний почек, реперфузионного повреждения при почечной ишемии, волчаночного нефрита, гломерулопатии, ревматоидного артрита, системной красной волчанки (SLE), SLE нефрита, мембранопролиферативного нефрита, гемолитической анемии, оптикомиелита, трансплантата почки, наследственной недостаточности CD59, псориаза и миастении гравис. В определенных других вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению можно использовать для лечения или предотвращения по меньшей мере одного симптома или показания C5-ассоциированного заболевания или нарушения, выбранных из группы, состоящей из заболеваний и нарушений легких, таких как диспноэ, гемоптизис, ARDS, астма, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), эмфизема, легочная эмболия и инфаркт, пневмония, фиброгенные пневмокониозы, повреждения, обусловленные инертной пылью и минералами (например, кремний, угольная пыль, бериллий и асбест), фиброз легких, органические пневмокониозы, химическое повреждение (из-за раздражающих газов и химических соединений, например, хлора, фосгена, диоксида серы, сероводорода, диоксида азота, аммиака и соляной кислоты), повреждение дымом, термическое повреждение (например, ожог, обморожение), астма, аллергия, бронхоконстрикция, пневмонит гиперчувствительности, паразитарные заболевания, синдром Гудпасчера, васкулит легких, наследственный отек Квинке и ассоциированное с иммунными комплексами воспаление.

В определенных вариантах осуществления антитела по изобретению можно использовать для лечения субъектов, страдающих глазным заболеванием, таким как возрастная дегенерация желтого пятна (AMD), диабетический отек желтого пятна (DME), диабетическая ретинопатия, глазной ангиогенез (глазная неоваскуляризация, поражающая ткань хориоида, роговицы или сетчатки), географическая атрофия (GA), увеит и оптикомиелит. Антитела по настоящему изобретению можно использовать для лечения или улучшения по меньшей мере одного симптома или показания сухой AMD или влажной AMD. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению можно использовать для предотвращения или снижения скорости потери зрения. В одном из вариантов осуществления антитела по настоящему изобретению можно использовать для уменьшения друз в глазу субъекта с AMD. В одном из вариантов осуществления антитела по настоящему изобретению можно использовать для предотвращения или уменьшения/замедления потери зрения у субъекта с AMD.

Одно или несколько антител по настоящему изобретению можно вводить для облегчения или предотвращения или снижения тяжести одного или нескольких симптомов или состояний/показаний глазного заболевания или нарушения. Антитела можно использовать для того, чтобы улучшать или снижать тяжесть по меньшей мере одного симптома, включая в качестве неограничивающих примеров потерю зрения, визуальное искажение, сложность адаптации с низким уровням осведения, искривленное центральное зрение, увеличение затемнения центрального/общего зрения, присутствие друз (мелкие скопления внеклеточного материала, которые образуются на сетчатке), пигментные изменения, искаженное зрение в форме метаморфопсии, при которой сетка из прямых линий выглядит волнистой и части сетки могут выглядеть пустыми, экссудативные изменения (геморрагии в глаз, обильный экссудат, субретинальное/под пигментным эпителием сетчатки/интраретинальное текучее вещество), медленное восстановление зрительной функции после воздействия яркого света (фотострессовый тест), начальную и географическую атрофию, существенное снижение остроты зрения (на два уровня или больше), например, с 20/20 до 20/80, преимущественные периметрические изменения повышенной остроты зрения (для влажной AMD), расфокусированное зрение, постепенную потерю центрального зрения (у тех, кто имеет не экссудативную дегенерацию желтого пятна, быстрое начало потери зрения (часто обусловленное подтеканием и кровотечением в аномальных кровеносных сосудах у субъекта с экссудативной дегенерацией желтого пятна, центральные скотомы (тени или выпадение полей зрения), трудности при различении цветов, в частности между темными и темными и между светлыми и светлыми, потерю контрастной чувствительности, прямые линии выглядят изогнутыми на сетке Амслера.

Также в настоящем описании предусмотрено использование одного или нескольких антител по настоящему изобретению профилактически у субъектов с риском развития дегенерации желтого пятна, таких как субъекты в возрасте старше 50, субъекты с семейным анамнезом дегенерации желтого пятна, курильщики и субъекты с ожирением, высоким холестерином, сердечнососудистыми заболеваниями или нездоровой диетой.

В дополнительном варианте осуществления изобретения данные антитела используют для получения фармацевтической композиции или лекарственного средства для лечения пациентов, страдающих заболеванием или нарушением, связанным с C5. В другом варианте осуществления изобретения, данные антитела используют в качестве вспомогательной терапии с любым другим средством или любой другой терапией, известными специалистам в данной области, которые можно использовать для лечения или улучшения заболевания или нарушения, связанного с C5.

Комбинированная терапия.

Комбинированная терапия может включать антитело против C5 по изобретению и любое дополнительное терапевтическое средство, которое может быть полезно в комбинации с антителом по изобретению или с биологически активным фрагментом антитела по изобретению. Антитела по настоящему изобретению можно комбинировать синергически с одним или несколькими лекарственными средствами или терапией, которые используют для лечения заболевания или нарушения, связанного с C5. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению можно комбинировать со вторым терапевтическим средством, чтобы улучшать один или несколько симптомов указанного заболевания.

В зависимости от C5-ассоциированного заболевания или нарушения, антитела по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, включая в качестве неограничивающих примеров антикоагулянт (например, варфарин, аспирин, гепарин, фениндион, фондапаринукс, идрапаринукс и ингибиторы тромбина, такие как аргатробан, лепирудин, бивалирудин или дабигатран), противовоспалительное лекарственное средство (например, кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства), антигипертензивное средство (например, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента), иммуносупрессорное средство (например, винкристин, циклоспорин A или метотрексат), фибринолитическое средство (например, анкрод, s-аминокапроновая кислота, антиплазмин-a1, простациклин и дефибртид), понижающее липиды средство, такое как ингибитор гидроксиметилглутарил-КоА-редуктазы, средство против CD20, такое как ритуксимаб, средство против TNF, такое как инфликсимаб, противосудорожное средство (например, сульфат магния), ингибитор C3 или антитромботическое средство.

В определенных вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой другое антитело к белку C5. В настоящем описании предусмотрено использование комбинации ("коктейля") антител с широкой нейтрализующей или ингибирующей активностью против C5. В некоторых вариантах осуществления не конкурирующие антитела можно комбинировать и вводить нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления антитела, содержащиеся в комбинации, связываются с отдельными не перекрывающимися эпитопами на белке. Антитела, содержащиеся в комбинации, могут блокировать связывание C5 с C5-конвертазой и/или могут предотвращать/ингибировать расщепление C5 до C5a и C5b. В определенных вариантах осуществления второе антитело может обладать более длительным временем полужизни в сыворотке человека.

Как используют в настоящем описании, термин "в комбинации с" обозначает, что дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить до, одновременно с или после введения антитела против C5 по настоящему изобретению. Термин "в комбинации с" также включает последовательное или сопутствующее введение антитела против C5 и второго терапевтического средства.

Дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить субъекту перед введением антитела против C5 по настоящему изобретению. Например, первый компонент можно считать подлежащим введению "перед" вторым компонентом, если первый компонент вводят за 1 неделю перед, 72 ч перед, 60 ч перед, 48 ч перед, 36 ч перед, 24 ч перед, 12 ч перед, 6 ч перед, 5 ч перед, 4 ч перед, 3 ч перед, 2 ч перед, 1 ч перед, 30 мин перед, 15 мин перед, 10 мин перед, 5 мин перед или меньше чем 1 мин перед введением второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить субъекту после введения антитела против C5 по настоящему изобретению. Например, первый компонент можно считать подлежащим введению "после" второго компонента, если первый компонент вводят через 1 мин после, 5 мин после, 10 мин после, 15 мин после, 30 мин после, 1 ч после, 2 ч после, 3 ч после, 4 ч после, 5 ч после, 6 ч после, 12 ч после, 24 ч после, 36 ч после, 48 ч после, 60 ч после, 72 ч после введения второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить субъекту одновременно со введением антитела против C5 по настоящему изобретению. "Одновременное" введение, для целей настоящего изобретения, включает, например, введение антитела против C5 и дополнительного терапевтически активного компонента субъекту в одной дозированной форме или в отдельных дозированных формах, вводимых субъекту в пределах приблизительно 30 мин или меньше друг от друга. При введении в отдельных дозированных формах, каждую дозированную форму можно вводить через один и тот же путь (например, оба антитела против C5 и дополнительный терапевтически активный компонент можно вво-

дить внутривенно и т.д.); альтернативно, каждую дозированную форму можно вводить через отличающийся путь (например, антитело против C5 можно вводить внутривенно и дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить перорально). В любом случае, введение компонентов в одной дозированной форме, в отдельных дозированных формах через один и тот же путь или в отдельных дозированных формах через различные пути - все считают "одновременным введением" для целей настоящего раскрытия. Для целей настоящего раскрытия, введение антитела против C5 "до", "одновременно с" или "после" (как эти термин определяют выше в настоящем описании) введения дополнительного терапевтически активного компонента считают введением антитела против C5 "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом.

Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антитело против C5 по настоящему изобретению совместно формулируют с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, как описано в другом месте в настоящем описании.

Схемы введения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, однократную дозу антитела против C5 по изобретению (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела против C5 и любого из дополнительных терапевтически активных средств, указанных в настоящем описании) можно вводить нуждающемуся в этом субъекту. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения, множество доз антитела против C5 (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела против C5 и любого из дополнительных терапевтически активных средств, указанных в настоящем описании) можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. Способы в соответствии с этим аспектом изобретения включают последовательное введение субъекту нескольких доз антитела против C5 по изобретению. Как используют в настоящем описании, "последовательное введение" обозначает, что каждую дозу антитела против C5 вводят субъекту в отличающийся момент времени, например, в отличающиеся сутки, отделенные предварительно определяемым интервалом (например, часы, сутки, недели или месяцы). Настоящее изобретение включает способы, которые включают последовательное введение пациенту одной начальной дозы антитела против C5, после чего следуют одна или несколько вторичных доз антитела против C5 и необязательно после чего следуют одна или несколько третичных доз антитела против C5.

Термин "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к хронологической последовательности введения антитела против C5 по изобретению. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также обозначают как "доза базового уровня"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Все начальные, вторичные и третичные дозы могут содержать одно и то же количество антитела против C5, но в целом могут отличаться друг от друга в отношении частоты введения. Однако в определенных вариантах осуществления количество антитела против C5, содержащегося в начальных, вторичных и/или третичных дозах, варьирует от одной к другой (например, корректируют вверх или вниз в зависимости от ситуации) во время курса лечения. В определенных вариантах осуществления две или больше (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале схемы лечения в качестве "загрузочных доз", после чего следуют последующие дозы, которые вводят на менее частой основе (например, "поддерживающие дозы").

В определенных образцовых вариантах осуществления настоящего изобретения, каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-48 ч (например, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5 или больше) после непосредственно предшествующей дозы. Фраза "непосредственно предшествующая доза", как используют в настоящем описании, обозначает, в последовательности из нескольких введений, дозу антитела против C5, которую вводят пациенту перед введением ближайшей следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

Способы в соответствии с этим аспектом изобретения могут включать введение пациенту любого числа вторичных и/или третичных доз антитела против C5. Например, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или больше (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше) вторичных доз. Аналогичным образом, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или больше (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше) третичных доз.

В определенных вариантах осуществления частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводят пациенту, может варьировать в ходе схемы лечения. Частоту введения также может корректировать во время хода лечения посредством врач в зависимости от потребностей конкретного пациента, после клинического обследования.

Диагностическое использование антител.

Антитела против C5 по настоящему изобретению можно использовать для того, чтобы обнаруживать и/или измерять C5 в образце, например, для диагностических целей. Некоторые варианты осуществления предусматривают использование одного или нескольких антител по настоящему изобретению в

анализах для того, чтобы обнаруживать С5-ассоциированное заболевание или нарушение. Образцовые диагностические анализы для С5 могут включать, например, приведение образца, полученного у пациента, в контакт с антителом против С5 по изобретению, где антитело против С5 метят поддающейся обнаружению меткой или репортерной молекулой или используют в качестве захватываемого лиганда для того, чтобы избирательно выделать С5 из образцов пациентов. Альтернативно, не меченное антитело против С5 можно использовать в диагностических применениях в комбинации со вторичным антителом, которое само метят с возможностью обнаружения. Поддающаяся обнаружению метка или репортерная молекула может представлять собой радиоизотоп, такой как $^{3}H$, $^{14}C$, $^{32}P$, $^{35}S$ или $^{125}I$; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеинизотиоцианат или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные образцовые анализы, которые можно использовать для того, чтобы обнаруживать или измерять С5 в образце, включают твердофазный иммуносорбентный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA) и активируемую флуоресценцией сортировку клеток (FACS).

Образцы, которые можно использовать в С5 диагностических анализах в соответствии с настоящим изобретением, включают любой образец ткани или текучего вещества, получаемый от пациента, который содержит поддающиеся обнаружению количества или белка С5 или его фрагментов, при нормальных или патологических состояниях. В целом, уровни белка С5 в конкретном образце, получаемом от здорового пациента (например, пациента, не пораженного заболеванием, связанным с С5), измеряют для того, чтобы изначально установить базовый или стандартный уровень С5. Этот базовый уровень С5 затем можно сравнивать с уровнями С5, измеренными в образцах, полученных у индивидуумов с подозрением на наличие С5-ассоциированного состояния или симптомами, связанными с таким состоянием.

Антитела со специфичностью к белку С5 могут не содержать дополнительные метки или фрагменты или они могут содержать N-концевую или С-концевую метку или фрагмент. В одном из вариантов осуществления меткой или фрагментом является биотин. В анализе связывания местоположение метки (если уместно) может определять ориентацию пептида относительно поверхности, с которой связывают пептид. Например, если поверхность покрывают авидином, пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентирован так, что С-концевая часть пептида будет дистальной относительно поверхности.

Избранные варианты осуществления.

Избранные варианты осуществления по настоящему раскрытию включают следующее.

В варианте осуществления 1, настоящее изобретение включает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком фактора 5 комплемента (С5), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, содержащимися в С5 (SEQ ID NO: 359), как определяют по водород-дейтериевому обмену.

В варианте осуществления 2, настоящее изобретение включает выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, содержащимися в α цепи и/или β цепи С5, как определяют по водород-дейтериевому обмену.

В варианте осуществления 3, настоящее изобретение включает выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по вариантам осуществления 1 или 2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не взаимодействуют с аминокислотой из областью анафилатоксина С5а из С5, как определяют по водород-дейтериевому обмену.

В варианте осуществления 4, настоящее изобретение включает выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления с 1 до 3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, содержащимися в SEQ ID NO: 360 и/или SEQ ID NO: 361, как определяют по водород-дейтериевому обмену.

В варианте осуществления 5, настоящее изобретение включает выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления с 1 до 4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействуют с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из (a) аминокислот с 591 до 599 из SEQ ID NO: 359; (b) аминокислот с 593 до 599 из SEQ ID NO: 359; (c) аминокислот с 775 до 787 из SEQ ID NO: 359; (d) аминокислот с 775 до 794 из SEQ ID NO: 359; и (e) аминокислот с 779 до 787 из SEQ ID NO: 359.

В варианте осуществления 6, настоящее изобретение включает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления с 1 до 5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействуют с по меньшей мере пятью аминокислотами, содержащимися в аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 360 и 361.

В варианте осуществления 7, настоящее изобретение включает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления с 1 до 5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействуют с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 360 и 361.

В варианте осуществления 8, настоящее изобретение включает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком фактора 5 комплемента (С5),

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействуют с по меньшей мере одним из следующих аминокислотных остатков: 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 или L794 из SEQ ID NO: 359.

В варианте осуществления 9, настоящее изобретение включает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления с 1 до 8, где антитело обладает одной или несколькими из следующих характеристик: (a) имеет концентрацию в сыворотке больше чем 10 мкг/мл до суток 70 при введении яванскому макаку; (b) блокирует классический путь (CP) гемолиза до суток 35 при введении яванскому макаку, как измеряют в анализе гемолиза ex vivo; (c) блокирует альтернативный путь (AP) гемолиза до суток 35 при введении яванскому макаку, как измеряют в анализе гемолиза ex vivo; (d) имеет время полужизни в сыворотке больше чем 10 суток у яванского макака; (e) имеет концентрацию в сыворотке больше чем 10 мкг/мл до суток 40 при введении C5-гуманизированным мышам; (f) блокирует CP гемолиз до суток 30 при введении C5-гуманизированным мышам, как измеряют в анализе гемолиза ex vivo; и (g) имеет время полужизни в сыворотке больше чем 10 суток у C5-гуманизированных мышей.

В варианте осуществления 10, настоящее изобретение включает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления с 1 до 9, где антитело обладает дополнительной характеристикой, выбранной из группы, состоящей из: (a) представляет собой моноклональное антитело полностью человека; (b) связывается с C5 человека с константой диссоциации ($K_D$) меньше чем 0,9 нМ при 25°C, как измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (c) связывается с C5 человека с $K_D$ меньше чем 0,3 нМ при 37°C, как измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (d) связывается с C5 обезьяны с $K_D$ меньше чем 65 нМ, как измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (e) связывается с вариантом C5 человека R885H (SEQ ID NO: 356) с $K_D$ меньше чем 0,5 нМ, как измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (f) связывается с вариантом C5 человека R885C (SEQ ID NO: 357) с $K_D$ меньше чем 0,5 нМ, как измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса; (g) блокирует опосредованный C5 человека классический путь (CP) гемолиза больше чем на 95% и с $IC_{50}$ меньше чем 6 нМ, как измеряют в анализе CP гемолиза; (h) блокирует опосредованный C5 человека альтернативный путь (AP) гемолиза больше чем на 70% и с $IC_{50}$ меньше чем 165 нМ, как измеряют анализе AP гемолиза; (i) ингибирует опосредованный C5 африканской зеленой мартышки CP гемолиз с $IC_{50}$ меньше чем 185 нМ, как измеряют в анализе CP гемолиза; (j) ингибирует опосредованный C5 африканской зеленой мартышки AP гемолиз с $IC_{50}$ меньше чем 235 нМ, как измеряют анализе AP гемолиза; (k) ингибирует опосредованный C5 яванского макака CP гемолиз с $IC_{50}$ меньше чем 145 нМ, как измеряют в анализе CP гемолиза; и (l) ингибирует опосредованный C5 яванского макака AP гемолиз с $IC_{50}$ меньше чем 30 нМ, как измеряют анализе AP гемолиза.

В варианте осуществления 11, настоящее изобретение включает выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления с 1 до 10, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой одной из последовательностей вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), перечисленных в табл. 1; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой одной из последовательностей вариабельной области легкой цепи (LCVR), перечисленных в табл. 1.

В варианте осуществления 12, настоящее изобретение включает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления с 1 до 11, которые содержат: (a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 124, 140, 148, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 276, 292, 308, 324 и 340; (b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 126, 142, 150, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 278, 294, 310, 326 и 342; (c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 128, 144, 152, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 280, 296, 312, 328 и 344; (d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 116, 132, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 284, 300, 316, 332 и 348; (e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 118, 134, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 286, 302, 318, 334 и 350; и (f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 120, 136, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 288, 304, 320, 336 и 352.

В варианте осуществления 13, настоящее изобретение включает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления с 1 до 12, содержащее HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1.

В варианте осуществления 14, настоящее изобретение включает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 13, содержащие LCVR, имеющую аминокислот-

ную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1.

В варианте осуществления 15, настоящее изобретение включает выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления с 11 до 14, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 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 и 338/346.

В варианте осуществления 16, настоящее изобретение включает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления с 11 до 15, содержащие три CDR, содержащиеся в HCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50, 98, 138 и 202; и три CDR, содержащиеся в LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 58, 106 и 210.

В варианте осуществления 17, настоящее изобретение включает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 16, содержащие CDR, выбранные из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 52, 54, 56, 60, 62 и 64; (b) SEQ ID NO: 1000, 102, 104, 108, 110 и 112; (c) SEQ ID NO: 140, 142, 144, 108, 110 и 112; и (d) SEQ ID NO: 204, 206, 208, 212, 214 и 216.

В варианте осуществления 18, настоящее изобретение включает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 17, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50/58, 98/106, 138/106 и 202/210.

В варианте осуществления 19, настоящее изобретение включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют за связывание с C5 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по варианту осуществления 17.

В варианте осуществления 20, настоящее изобретение включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 17.

В варианте осуществления 21, настоящее изобретение включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 9 или 10, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, перечисленную в табл. 1, имеющую не больше 5 замен аминокислот.

В варианте осуществления 22, настоящее изобретение включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 21, которые содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, перечисленную в табл. 1, имеющую не больше 5 замен аминокислот.

В варианте осуществления 23, настоящее изобретение включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 9 или 10, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO: 98.

В варианте осуществления 24, настоящее изобретение включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 23, содержащие вариабельную область легкой цепи, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO: 106.

В варианте осуществления 25, настоящее изобретение включает выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, блокирующие расщепление C5 на C5a и C5b, которые содержат три CDR из HCVR, где HCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 122, 138, 146, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 274, 290, 306, 322 и 338; и три CDR из LCVR, где LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 114, 130, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 282, 298, 314, 330 и 346.

В варианте осуществления 26, настоящее изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с C5 в соответствии с любым одним из вариантов осуществления с 1 до 25, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В варианте осуществления 27, настоящее изобретение включает выделенную молекулу полинуклеотида, содержащего полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR антитела, как изложено в любом одном из вариантов осуществления с 1 до 25.

В варианте осуществления 28, настоящее изобретение включает выделенную молекулу полинуклеотида, содержащую полинуклеотидную последовательность, которая кодирует LCVR антитела, как изложено в любом одном из вариантов осуществления с 1 до 25.

В варианте осуществления 29, настоящее изобретение включает вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность по варианту осуществления 27 или 28.

В варианте осуществления 30, настоящее изобретение включает клетку, экспрессирующую вектор по варианту осуществления 29.

В варианте осуществления 31, настоящее изобретение включает способ предотвращения, лечения

или улучшения по меньшей мере одного симптома или показания заболевания или нарушения, связанного с C5, способ включает введения антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления с 1 до 25 нуждающемуся в этом субъекту.

В варианте осуществления 32, настоящее изобретение включает способ по варианту осуществления 31, в котором заболевание или нарушение выбирают из группы, состоящей из атипичного гемолитико-уремического синдрома (aHUS), пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), возрастной дегенерации желтого пятна, географической атрофии, увеита, оптикомиелита, рассеянного склероза, инсульта, синдрома Гийена-Барре, травматического повреждения головного мозга, болезни Паркинсона, нарушений ненадлежащей или нежелательной активации комплемента, осложнений гемодиализа, сверхострого отторжения аллотрансплантата, отторжения ксенотрансплантата, индуцированной интерлейкином-2 токсичности во время терапии IL-2, воспалительных нарушений, воспаления при аутоиммунных заболеваниях, болезни Крона, респираторного дистресс-синдрома взрослых, термического повреждения, включая ожоги или обморожения, постишемических реперфузионных состояний, инфаркта миокарда, синдрома повышенной проницаемости капилляров, ожирения, диабета, болезни Альцгеймера, шизофрении, инсульта, эпилепсии, атеросклероза, васкулита, буллезного пемфигоида, C3-гломерулопатии, мембрано-пролиферативного гломерулонефрита, диабетической нефропатии, синдрома Альпорта, прогрессирующей почечной недостаточности, протеинурических заболеваний почек, реперфузионного повреждения при почечной ишемии, волчаночного нефрита, баллонной ангиопластики, постгемодиализного синдрома при сердечно-легочном шунтировании или почечном шунтировании, гемодиализа, почечной ишемии, реперфузии брыжеечной артерии после реконструкции аорты, инфекционного заболевания или сепсиса, нарушений иммунных комплексов и аутоиммунных заболеваний, почечных нарушений, ревматоидного артрита, системной красной волчанки (SLE), SLE нефрита, пролиферативного нефрита, гемолитической анемии, астмы, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), эмфиземы, легочных эмболий и инфарктов, пневмонии и миастении гравис.

В варианте осуществления 33, настоящее изобретение включает способ по варианту осуществления 31, в котором заболевание или нарушение представляет собой aHUS.

В варианте осуществления 34, настоящее изобретение включает способ по варианту осуществления 31, в котором заболевание или нарушение представляет собой PNH.

В варианте осуществления 35, настоящее изобретение включает способ по любому из вариантов осуществления 31-34, в котором фармацевтическую композицию вводят профилактически или терапевтически субъекту, нуждающемуся в этом.

В варианте осуществления 36, настоящее изобретение включает способ по любому из вариантов осуществления с 31 до 35, в котором фармацевтическую композицию вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством.

В варианте осуществления 37, настоящее изобретение включает способ по варианту осуществления 36, в котором второе терапевтическое средство выбирают из группы, состоящей из антикоагулянта, противовоспалительного лекарственного средства, антигипертензивного средства, иммуносупрессорного средства, понижающего липиды средства, средства против CD20, такого как ритуксимаб, средства против TNF, такого как инфликсимаб, противосудорожного средства, ингибитора C3, второго антитела против C5 и антитромботического средства.

В варианте осуществления 38, настоящее изобретение включает способ по любому из вариантов осуществления с 31 до 37, в котором фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутривенно, внутрикожно, интраперитонеально, перорально, внутримышечно или внутрь черепа.

**Примеры**

Следующие примеры приведены с тем, чтобы предоставить средним специалистам в данной области полное раскрытие и описание того, как получать и использовать способы и композиции по изобретению, и не предназначены для того, чтобы ограничивать объем того, что авторы изобретения считают своим изобретением. Предприняты усилия к тому, чтобы обеспечить точность в отношении используемых чисел (например, количество, температура и т.д.), но некоторые экспериментальные ошибки и отклонения следует принимать во внимание. Если не указано иное, части представляют собой массовые части, молекулярная масса представляет собой усредненную молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет приблизительно 25°C и давление равно атмосферному или близко к нему.

Пример 1: создание антител человека к белку фактора 5 комплемента (C5).

Антитела человека к белку C5 создавали у мыши VELOCIMMUNE®, содержащей ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой и легкой к цепи иммуноглобулина человека. Мышей иммунизировали очищенным сывороточным белком C5 человека (Calbiochem № по каталогу 20-4888).

Мониторинг антительного иммунного ответа осуществляли посредством C5-специфического иммунологического анализа. Когда достигали желаемого иммунного ответа, спленоциты собирали и сливали с миеломными клетками мыши, чтобы сохранять их жизнеспособность и формировать гибридомные клеточные линии. Осуществляли скрининг и отбор гибридомных клеточных линий для того, чтобы идентифицировать клеточные линии, которые продуцируют C5-специфические антитела. Клеточные линии

использовали для получения нескольких химерных антител против C5 (т.е. антител, содержащих вариабельные домены человека и константные домены мыши); образцовые антитела, созданные таким образом, обозначали как H2M11683N и H2M11686N.

Антитела против C5 также выделяли непосредственно из антиген-положительных B-клеток мышей без слияния с миеломными клетками, как описано в патенте США 7582298, включенном в настоящее описание конкретно по ссылке в полном объеме. Используя этот способ, получали несколько антител полностью человека против C5 (т.е. антител, содержащих вариабельные домены человека и константные домены человека); образцовые антитела, созданные таким образом, обозначали как H4H12159P, H4H12161P, H4H12163P, H4H12164P, H4H12166P, H4H12167P, H4H12168P, H4H12169P, H4H12170P, H4H12171P, H4H12175P, H4H12176P2, H4H12177P2 и H4H12183P2.

Биологические свойства образцовых антител, созданных в соответствии со способами из этого примера, описаны подробно в примерах, приведенных далее.

Пример 2: аминокислотные и нуклеотидные последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей.

В табл. 1 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей и CDR выбранных антител против C5 по изобретению.

Таблица 1

Идентификаторы аминокислотных последовательностей

| | SEQ ID NO: | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Обозначение антитела | HCVR | HCDR 1 | HCDR 2 | HCDR 3 | LCVR | LCDR 1 | LCDR 2 | LCDR 3 |
| 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 |

Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты приведены в

табл. 2.

Таблица 2

Идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты

| | SEQ ID NO: | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Обозначение антитела | HCVR | HCDR 1 | HCDR 2 | HCDR 3 | LCVR | LCDR 1 | LCDR 2 | LCDR 3 |
| 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 |

Антитела обычно обозначают в настоящем описании в соответствии со следующей номенклатурой: префикс Fc (например "H4H", "H2M" и т.д.), за которым следует цифровой идентификатор (например "11686", "12166", "12183" и т.д., как показано в табл. 2), за которым следует суффикс "P", "P2" или "N". Таким образом, в соответствии с этой номенклатурой, антитело можно обозначать в настоящем описании, например, как "H2M11686N", "H4H12183P2", "H4H12168P" и т.д. Префиксы H4H и H2M в обозначениях антител, используемых в настоящем описании, указывают на конкретный изотип Fc-области антитела. Например, "H4H" антитело имеет Fc IgG4 человека, содержащую мутацию серина в пролин в шарнирной области (S108P), чтобы содействовать стабилизации димера, а "H2M" антитело имеет Fc IgG2 мыши (изотип a или b) (все вариабельные области являются полностью человеческими, как обозначено с помощью первой "H" в обозначении антитела). Специалист в данной области примет во внимание, что антитело, содержащее Fc конкретного изотипа, можно превращать в антитело с Fc другого изотипа (например, антитело с Fc IgG1 мыши можно превращать в антитело с IgG4 человека и т.д.), но в любом случае вариабельные домены (в том числе CDR), которые обозначены с помощью цифровых идентификаторов, которые представлены в табл. 2, будут оставаться теми же, и ожидают, что свойства связывания с антигеном будут идентичными или по существу схожими, независимо от природы домена Fc.

В определенных вариантах осуществления выбранные антитела с Fc IgG1 мыши превращали в ан-

тителя с Fc IgG4 человека. В одном из вариантов осуществления домен Fc IgG4 содержит 2 или больше аминокислотных замен, как раскрыто в US20100331527.

Для того чтобы создавать мутированные антитела, различные остатки в определяющих комплементарность областях (CDR) из H4H12166P мутировали в гистидин для того, чтобы создавать 9 мутированных антител, идентифицированных как от H4H12166P2 до H4H12166P10. Показано, что гистидиновые мутации в CDR придают зависимость от pH связыванию с целевым антигеном, что ведет к усовершенствованной фармакокинетике (Igawa et al. 2010, Nat. Biotechnol. 28: 1203-1207).

Контрольные конструкции, используемые в следующих примерах.

Следующие контрольные конструкции (антитела против C5) включали в эксперименты, раскрытые в настоящем описании, в целях сравнения: "объект сравнения 1", моноклональное антитело против C5 человека, имеющее последовательности $V_H/V_L$ из антитела "h5G1.1" в соответствии с патентом США № 6355245 (Alexion Pharmaceuticals, Inc.); и "объект сравнения 2", моноклональное антитело человека против C5 человека, имеющее последовательности $V_H/V_L$ из антитела "8109" в соответствии с публикацией патентной заявки США № 2013/0022615 (Novartis).

Пример 3: связывание антитела с C5, как определяют посредством поверхностного плазмонного резонанса.

Равновесные константы диссоциации (значения $K_D$) для связывания C5 с очищенными антителами против C5 определяли с использованием биосенсорного анализа поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени на приборе Biacore T200. Поверхность датчика Biacore дериватизировали посредством аминного связывания с моноклональным антителом мыши против Fc человека (GE Healthcare, № BR-1008-39), чтобы захватывать антитела против C5, экспрессируемые с константными областями Fc человека. Исследования связывания Biacore проводили в подвижном буфере HBST (0,01M HEPES pH 7,4, 0,15M NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% об./об. поверхностно-активного средства P20). C5 человека получали из коммерческого источника (EMD). Другие реактивы C5 экспрессировали с C-концевой myc-myc-гексагистидиновой меткой (впоследствии обозначаемой как C5-mmh). Также экспрессировали реактивы C5-mmh человека, содержащие гистидиновые и цистеиновые точечные мутации по аргинину 885 (впоследствии обозначаемые как C5 R885H-mmh и C5 R885C-mmh, соответственно). Различные концентрации C5 человека, C5 человека R885H-mmh (SEQ ID NO: 356), C5 человека R885C-mmh (SEQ ID NO: 357) и C5 обезьяны-mmh (SEQ ID NO: 358) (в диапазоне от 100 нМ до 1,23 нМ, 3-кратные разведения) полученные в подвижном буфере HBST, впрыскивали на поверхность с захваченным антителом против C5 при скорости потока 30 мкл/мин. Осуществляли мониторинг ассоциации всех C5 реактивов с каждым из захваченных моноклональных антител в течение 3 мин, и осуществляли мониторинг их диссоциации в подвижном буфере HBST в течение 8 мин. Все эксперименты по кинетике связывания осуществляли при 25°C или 37°C. Кинетические константы скорости ассоциации ($k_a$) и диссоциации ($k_d$) определяли посредством аппроксимации сенсограмм реального времени к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения аппроксимации кривых Scrubber 2.0c. Равновесные константы диссоциации связывания ($K_D$) и диссоциационное время полужизни ($t_{1/2}$) вычисляли по кинетическим константам скорости: $K_D(M)=k_d/k_a$ и $t_{1/2}(\text{мин})=\ln_2/(60\times k_d)$.

Кинетические параметры связывания для связывания C5 человека с антителами против C5 при 25°C и 37°C представлены в табл. 3 и 4.

Таблица 3

Кинетические параметры связывания для связывания моноклональных антител против C5 с C5 человека при 25°C

| Антитело | Количество захваченного | 100 нМ C5 человека | $k_a$ | $k_d$ | $K_D$ | $t_{1/2}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | (1/Мс) | (1/с) | (М) | (мин) |
| | антитела (RU) | связанн. (RU) | | | | |
| 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 |
| объект сравнения 1 | 232 | 250 | 9,69E+04 | 1,46E-04 | 1,51E-09 | 79 |
| объект сравнения 2 | 117 | 170 | 2,62E+05 | 2,39E-04 | 9,12E-10 | 48 |

Таблица 4

Кинетические параметры связывания для связывания моноклональных антител против C5 с C5 человека при 37°C

| Антитело | Количество захваченного антитела (RU) | 100 нМ C5 человека связанн. (RU) | $k_a$ (1/Мс) | $k_d$ (1/с) | $K_D$ (М) | $t_{1/2}$ (мин) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 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 |
| объект сравнения 1 | 185 | 246 | 1,47E+05 | 5,30E-04 | 3,61E-09 | 22 |
| объект сравнения 2 | 119 | 205 | 2,85E+05 | 6,57E-04 | 2,30E-10 | 18 |

Связывание C5 обезьяны-mmh с антителами против C5 при 25°C и 37°C представлено в табл. 5 и 6.

Таблица 5

Кинетические параметры связывания для связывания моноклональных антител против C5 с C5 обезьяны-mmh при 25°C

| Антитело | Количество захваченного антитела (RU) | 100 нМ C5 обезьяны-mmh связанн. (RU) | $k_a$ (1/Мс) | $k_d$ (1/с) | $K_D$ (М) | $t_{1/2}$ (мин) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 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 |
| объект сравнения 1* | 228 | 11 | N/A | N/A | 3,11E-07 | N/A |

N/A - не доступно; *SS - анализ устойчивого состояния.

Таблица 6

Кинетические параметры связывания для связывания моноклональных антител против C5 с C5 обезьяны-mmh при 37°C

| Антитело | Количество захваченного антитела (RU) | 100 нМ C5 обезьяны-mmh связанн. (RU) | $k_a$ (1/Мс) | $k_d$ (1/с) | $K_D$ (М) | $t_{1/2}$ (мин) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 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 |
| объект сравнения 1 | 132 | 4 | NB | NB | NB | NB |

Связывание C5 человека R885H-mmh и C5 человека R885C-mmh с антителами против C5 при 25°C представлено в табл. 7 и 8, соответственно.

Таблица 7

Кинетические параметры связывания для связывания моноклональных антител против C5 с C5 человека R885H-mmh при 25°C

| Антитело | Количество захваченного антитела (RU) | 100 нМ C5 человека R885H-mmh связанн. (RU) | $k_a$ (1/Мс) | $k_d$ (1/с) | $K_D$ (М) | $t_{1/2}$ (мин) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 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 |
| объект | 87 | 11 | NB | NB | NB | NB |
| сравнения 1 | | | | | | |
| объект сравнения 2 | 118 | 249 | 1,08E+06 | 6,53E-04 | 6,06E-10 | 18 |

Таблица 8

Кинетические параметры связывания для связывания моноклональных антител против C5 с C5 человека R885C-mmh при 25°C

| Антитело | Количество захваченного антитела (RU) | 100 нМ C5 человека R885C-mmh связанн. (RU) | $k_a$ (1/Мс) | $k_d$ (1/с) | $K_D$ (М) | $t_{1/2}$ (мин) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 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 |
| объект сравнения 1 | 87 | 9 | NB | NB | NB | NB |
| объект сравнения 2 | 117 | 241 | 1,17E+06 | 6,19E-04 | 5,30E-10 | 19 |

Связывание C5 человека R885H-mmh и C5 человека R885C-mmh с антителами против C5 при 37°C представлено в табл. 9 и 10, соответственно.

Таблица 9

Кинетические параметры связывания для связывания моноклональных антител против C5 с C5 человека R885H-mmh при 37°C

| Антитело | Количество захваченного антитела (RU) | 100 нМ C5 человека R885H-mmh | $k_a$ | $k_d$ | $K_D$ | $t_{1/2}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Связанн. (RU) | (1/Мс) | (1/с) | (М) | (мин) |
| 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 |
| объект сравнения 1 | 41 | 5 | NB | NB | NB | NB |
| объект сравнения 2 | 23 | 47 | 8,39E+05 | 1,05E-03 | 1,25E-09 | 11 |

Таблица 10

Кинетические параметры связывания для связывания моноклональных антител против C5 с C5 человека R885C-mmh при 37°C

| Антитело | Количество захваченного антитела (RU) | 100 нМ C5 человека R885C-mmh связанн. (RU) | $k_a$ (1/Мс) | $k_d$ (1/с) | $K_D$ (М) | $t_{1/2}$ (мин) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 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 |
| объект сравнения 1 | 41 | 2 | NB | NB | NB | NB |
| объект сравнения 2 | 23 | 42 | 7,34E+05 | 1,07E-03 | 1,45E-09 | 11 |

При 25°C все 25 антител против C5 по изобретению связывались с C5 человека со значениями $K_D$ в диапазоне от 73 пМ до 8,4 нМ, как показано в табл. 3. При 37°C антитела против C5 по изобретению связывались с C5 человека со значениями $K_D$ в диапазоне от 103 пМ до 18,5 нМ, как показано в табл. 4. При 25°C 25 из 25 тестированных антител против C5 по изобретению связывались с C5 обезьяны-mmh со значениями $K_D$ в диапазоне от 133 пМ до 64 нМ, как показано в табл. 5. При 37°C 25 из 25 тестированных антител против C5 по изобретению связывались с C5 обезьяны-mmh со значениями $K_D$ в диапазоне

от 133 пМ до 118 нМ, как показано в табл. 6. При 25°С 16 из 16 тестированных антител против С5 по изобретению связывались с С5 человека R885H-mmh со значениями $K_D$ в диапазоне от 147 пМ до 10,9 нМ, как показано в табл. 7. При 25°С 16 из 16 тестированных антител против С5 по изобретению связывались с С5 человека R885C-mmh со значениями $K_D$ в диапазоне от 251 пМ до 190 нМ, как показано в табл. 8. При 37°С 16 из 16 тестированных антител против С5 по изобретению связывались с С5 человека R885H-mmh со значениями $K_D$ в диапазоне от 1,49 нМ до 69,4 нМ, как показано в табл. 9. При 25°С 16 из 16 тестированных антител против С5 по изобретению связывались с С5 человека R885C-mmh со значениями $K_D$ в диапазоне от 1,74 нМ до 159 нМ, как показано в табл. 10.

Пример 4: связывание антител с С5 при различных pH.

Эффект pH, оказываемый на скорость диссоциации рекомбинантного С5 человека, связанного с очищенными моноклональными антителами против С5, определяли с использованием биосенсора поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени на приборе Biacore T200. Поверхность датчика Biacore сначала дериватизировали посредством аминного связывания с моноклональным антителом мыши против Fc человека (GE, № BR-1008-39) для того, чтобы захватывать моноклональные антитела против С5, экспрессируемые с Fc IgG4 человека. Все исследования связывания Biacore осуществляли с использованием двух подвижных буферов PBS-T pH 7,4 (0,01M $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4$, 0,15M NaCl, 0,05% об./об. Tween-20, pH корректировали до 7,4) и PBS-T pH 6,0 (0,01M $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4$, 0,15M NaCl, 0,05% об./об. Tween-20, pH корректировали до 6,0). Различные концентрации С5 человека (EMD, № по каталогу 204888) или С5 обезьяны.mmh (полученного в PBS-T pH 7,4 подвижном буфере (в диапазоне от 100 нМ до 11,11 нМ, 3-кратные разведения) впрыскивали на поверхность с захваченным моноклональным антителом против С5 в течение 3 мин при скорости потока 50 мкл/мин и осуществляли мониторинг их диссоциации в двух подвижных буферах PBS-T pH 7,4 и PBS-T pH 6,0 в течение 6 мин. Все эксперименты по кинетике связывания осуществляли при 25°С и 37°С. Кинетическую константу диссоциации ($k_d$) определяли посредством аппроксимации сенсограмм реального времени к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения аппроксимации кривых Scrubber 2.0c. Диссоциационное время полужизни ($t_{1/2}$) при связывании вычисляли по $k_d$ как: $t_{1/2}(\text{мин})=\ln(2)/60\times k_d$.

Соотношения времени полужизни для связывания С5 человека с различными моноклональными антителами против С5 при 25°С и 37°С в двух подвижных буферах PBS-T pH 7,4 и PBS-T pH 6,0 представлены в табл. 11 и 12.

Таблица 11

Соотношения времени полужизни выбранных антител против С5 для С5 человека при 25°С

| Захваченное mAb | Соотношение $t_{1/2}$ |
|---|---|
| | pH 7,4/pH 6,0 |
| 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 - неубедительно.

Таблица 12

Соотношения времени полужизни выбранных антител против C5 для C5 человека при 37°C

| Захваченное mAb | Соотношение $t_{1/2}$ |
|---|---|
| | pH 7,4/pH 6,0 |
| 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 - неубедительно.

Соотношения времени полужизни для связывания C5 обезьяны с различными моноклональными антителами против C5 при 25°C и 37°C в двух подвижных буферах PBS-T pH 7,4 и PBS-T pH 6,0 представлены в табл. 13 и 14.

Таблица 13

Соотношения времени полужизни выбранных антител против C5 для C5 обезьяны при 25°C

| Захваченное mAb | Соотношение $t_{1/2}$ |
|---|---|
| | pH 7,4/pH 6,0 |
| H4H12169P | 3,4 |
| H4H12176P2 | ≥ 9,1 |
| H4H12161P | IC |
| H4H12159P | 1,2 |
| H4H12170P | ≥ 1,7 |
| H4H12166P | 18,5 |
| H4H12183P2 | 5,8 |
| H4H12167P | 9,2 |
| H4H12164P | 2,9 |
| H4H12163P | 9,7 |
| H4H12175P | 3,6 |
| H4H12177P2 | 3,7 |
| H4H12171P | 2,1 |
| H4H12168P | 3,8 |
| H4H11683N | 0,34 |
| H4H11686N | 0,37 |

IC - неубедительно.

Таблица 14

Соотношения времени полужизни выбранных антител против C5 для C5 обезьяны при 37°C

| Захваченное mAb | Соотношение $t_{1/2}$ |
|---|---|
| | pH 7,4/pH 6,0 |
| 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 - неубедительно.

Как показано в табл. 11-14, выбранные антитела против C5 демонстрировали pH-зависимое связывание, как видно по соотношениям $t_{1/2}$.

Пример 5: перекрестная конкуренция Octet между антителами против C5.

Конкуренцию связывания между моноклональными антителами против C5 (mAb) определяли с использованием анализа интерферометрии биослоев без метки в реальном времени на биосенсоре Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.). Весь эксперимент осуществляли при 25°C в 0,01M HEPES, pH 7,4, 0,15M NaCl, 0,05% об./об. поверхностно-активного средства Tween-20, 0,1 мг/мл BSA (буфер Octet HBS-P) при встряхивании пластины на скорости 1000 об./мин. Для того чтобы оценивать, способны ли 2 антитела конкурировать друг с другом за связывание с соответствующими им эпитопами на C5 человека (hC5, очищенный от плазмы, EMD), приблизительно 1,5 нм mAb против C5 человека сначала захватывали на кончиках биосенсора Octet, покрытых антителом против hFc (Pall ForteBio Corp., № 18-5060), посредством погружения кончиков на 3 мин в лунки, содержащие раствор mAb против C5 человека 50 мкг/мл (далее обозначают как mAb1). Затем кончики биосенсора с захваченными антителами насыщали блокирующим H4H изотипическим контрольным mAb (далее обозначают как блокирующее mAb) посредством погружения в лунки, содержащие раствор блокирующего mAb 200 мкг/мл на 4 мин. Затем кончики биосенсора погружали в лунки, содержащие со-комплексный раствор 50 нМ hC5 и 1 мкМ второго mAb против C5 человека (далее обозначают как mAb2), который предварительно инкубировали в течение 2 ч, на 4 мин. Кончики биосенсора промывали в буфере Octet HBS-P между всеми стадиями эксперимента. Мониторинг ответа связывания в реальном времени осуществляли во время хода эксперимента и регистрировали ответ связывания в конце каждой стадии. Ответ связывания C5 человека, предварительно образовавшего комплекс с mAb2, на mAb1 корректировали по фоновому связыванию, сравнивали и определяли конкурентное/неконкурентное поведение различных моноклональных антител против C5.

В табл. 15 в явной форме определены зависимости для антител, конкурирующих в обоих направлениях, независимо от порядка связывания.

Таблица 15

Перекрестная конкуренция между парами выбранных антител против C5

| Первое mAb (mAb1), захваченное с использованием биосенсоров AHC Octet | Антитела mAb2, для которых показана конкуренция с mAb1 |
|---|---|
| H4H12183P2 | H4H12167P; H4H12166P; H4H12163P |
| H4H12167P | H4H12183P2; H4H12166P; H4H12163P |
| H4H12166P | H4H12183P2; H4H12167P; H4H12163P |
| H4H12163P | H4H12183P2; H4H12167P; H4H12166P |
| H4H12159P | H4H12169P; H4H11683N; H4H12170P |
| H4H12169P | H4H12159P; H4H11683N; H4H12170P |
| H4H11683N | H4H12159P; H4H12169P; H4H12170P |
| H4H12170P | H4H12159P; H4H12169P; H4H11683N |
| H4H12175P | H4H12177P2 |
| H4H12177P2 | H4H12175P |
| H4H12176P2 | H4H12164P |
| H4H12164P | H4H12176P2 |
| H4H12168P | нет |
| H4H12161P | нет |
| H4H11686N | нет |

Пример 6: ингибирование C5-опосредованной комплемент-зависимой цитотоксичности в биоанализе B-клеток.

В этом примере описан биоанализ для того, чтобы тестировать роль C5 с использованием антитела против CD20 в классическом пути комплемента. Показано, что терапевтические антитела против CD20 к специфическому антигену CD20 клеточной поверхности B-клеток ведут к CDC в B-клетках (Glennie et al. 2007, Mol. Immunol. 44: 3823-3837), и ранее описан CDC анализ с использованием клеточных линий, экспрессирующих CD20 (Flieger et al. 2000, Cell. Immunol. 204: 55-63). Клетки Daudi, B-клеточную линию человека, экспрессирующую CD20, сыворотку с сохраненным комплементом или истощенную по C5 сыворотку с экзогенными вариантами C5 и антитело против CD20 (антитело, содержащее $V_H/V_L$ из "2F2" из патента США 8529902) использовали для того, чтобы оценивать роль активности C5 в CDC.

В биоанализе CDC для C5 клетки Daudi высевали в 96-луночные аналитические планшеты по 10000 клеток/лунка или в RPMI, содержащей 10% FBS, пенициллин/стрептомицин, L-глутамин, пируват натрия и заменимые аминокислоты (полная среда RPMI), или в RPMI, содержащей 1% BSA, пенициллин/стрептомицин и L-глутамин (RPMI/BSA). Все анализы с тестированием мутированных антител против hC5, наряду с тестированием не мутированных антител с C5-содержащей сывороткой человека, про-

водили в полной среде RPMI, тогда как анализы с тестированием не мутированных антител с сывороткой африканской зеленой мартышки и вариантами C5 человека проводили в среде RPMI/BSA. Для того чтобы измерять CDC с использованием сыворотки человека или обезьяны, антитело против CD20 разводили 1:3 от 100 нМ до 2 пМ (включая контрольный образец, не содержащий антитело) и инкубировали с клетками в течение 10 мин при 25°C, после чего следовало добавление 1,66% сыворотки или 1,66% истощенной по C5 сыворотки и 6,6 нМ вариантов C5 белка. Количество белка C5, добавляемое в истощенную по C5 сыворотку, основано на приводимом значении концентрации C5 в сыворотке человека 0,37 мкМ (Rawal et al 2008, J. Biol. Chem. 283: 7853-7863). Для того чтобы тестировать ингибирование CDC антителом к C5, антитела к C5 разводили 1:3 от 100 нМ до 2 пМ (включая контрольный образец, не содержащий антитело) и инкубировали с 1,66% сывороткой или 1,66% истощенной по C5 сывороткой и 6,6 нМ вариантов C5 белка в течение 30 мин. За 10 мин перед добавлением антител с сывороткой к клеткам, антитело против CD20 добавляли к клеткам по 1, 2, 3, 3,5, 7, 10 или 30 нМ. По окончанию инкубации с антителом против CD20, смесь антитело/сыворотка добавляли к клеткам. Цитотоксичность измеряли после 3,5 ч инкубации при 37°C и в 5% $CO_2$, после чего следовало 15 мин инкубации при 25°C и добавление реактива CytoTox-Glo™ (Promega, № G9292). CytoTox-Glo™ представляет собой люминесцентный реактив, который измеряет гибель клеток так, что увеличенную люминесценцию наблюдают при увеличенной цитотоксичности (измеряют в относительных световых единицах, RLU). Клетки без обработки в контрольных лунках лизировали посредством обработки дигитонином непосредственно после добавления реактива CytoTox-Glo™ для того, чтобы определять максимальную гибель клеток. Люминесценцию в планшетах считывали с помощью прибора Victor X (Perkin Elmer) через 15 мин после добавления CytoTox-Glo™. Где вычислено, процентную долю цитотоксичности вычисляли с использованием значений RLU, используя следующее уравнение:

% цитотоксичности=100× (экспериментальный лизис клеток - фоновый лизис клеток)/(максимальный лизис клеток - фоновый лизис клеток).

В этом уравнении "фоновый лизис клеток" представляет собой люминесценцию клеток, которые обрабатывали только средами и сывороткой без какого-либо антитела против CD20, а "максимальный лизис клеток" представляет собой люминесценцию клеток, которые обрабатывали дигитонином. Результаты, выраженные в виде % цитотоксичности или RLU, анализировали с использованием нелинейной регрессии (4-параметрическая логистическая) и программного обеспечения Prism 5 (GraphPad), чтобы получать значения $EC_{50}$ и $IC_{50}$. Ингибирование для антител вычисляли так, что ингибирование от 0 до 100% представляет собой диапазон ингибирования от концентрации антитела против CD20, используемого в анализе, без ингибитора до 0 нМ антитела против CD20.

Результаты.

Всего 25 антител против C5 человека, 16 не мутированных и 9 мутированных, тестировали на их способность ингибировать C5 в CDC анализе с использованием клеток Daudi с антителом против CD20 и сывороток человека (с нормальным hC5 или вариантами C5) или сывороток африканской зеленой мартышки. Различные остатки в определяющих комплементарность областях (CDR) из H4H12166P мутировали в гистидины для того, чтобы создавать 9 мутированных антител, H4H12166P2-H4H12166P10. Показано, что гистидиновые мутации в CDR придают зависимость от pH связыванию с целевым антигеном, что ведет к усовершенствованной фармакокинетике (Igawa et al. 2010, Nat. Biotechnol.28: 1203-1207).

Таблица 16

Ингибирование CDC не мутированным антителом против hC5 с использованием 1,66% сыворотки и антитела против CD20 в клетках Daudi

| Сыворотка | Человек | Человек | Африканская зеленая мартышка | Истощенная по C5 человека и 6,6 нМ варианта C5 R885H | Истощенная по C5 яеловека и 6,6 нМ варианта C5 R885C |
|---|---|---|---|---|---|
| $EC_{50}$ [M] антитела против CD20 (с 1,66% сывороткой) | 1,0E-09 | 1,4E-09 | 2,4E-09 | 1,9E-09 | 2,7E-09 |

| Постоянное антитело против CD20 (с 1,66% сывороткой) | 1 нМ | | 3 нМ | 3,5 нМ | 30 нМ |
|---|---|---|---|---|---|
| Антитело | $IC_{50}$ [M] | | $IC_{50}$ [M] (макс. % ингибирования)* | $IC_{50}$ [M] | $IC_{50}$ [M] (макс. % ингибирования)* |
| H4H11683N | Не тестировали | 1,2E-09 | 4,0E-09 | 1,3E-09 | 9,0E-10 |
| H4H11686N | Не тестировали | 1,5E-09 | 4,4E-09 | 1,1E-09 | 4,5E-10 |
| H4H12159P | 3,2E-09 | Не тестировали | 3,4E-09 | 1,4E-09 | 1,0E-09 |
| H4H12161P | 2,4E-09 | Не тестировали | 2,6E-09 | 1,8E-09 | 1,0E-09 |
| H4H12163P | 3,4E-09 | Не тестировали | 3,7E-09 | 2,1E-09 | 1,1E-09 |
| H4H12164P | 2,4E-09 | Не тестировали | 5,8E-09 | 1,8E-09 | 8,2E-10 |
| H4H12166P | 2,6E-09 | Не тестировали | 4,5E-09 | 1,3E-09 | 4,6E-10 |
| H4H12167P | 2,5E-09 | Не тестировали | 3,5E-09 | 1,9E-09 | 1,0E-09 |
| H4H12168P | 1,5E-09 | Не тестировали | 2,0E-09 | 2,3E-09 | 8,6E-10 |
| H4H12169P | 1,7E-09 | Не тестировали | 2,9E-09 | 1,3E-09 | 6,7E-10 |
| H4H12170P | 2,0E-09 | Не тестировали | 3,7E-09 | 4,8E-10 | 4,3E-10 |
| H4H12171P | 1,9E-09 | Не тестировали | 3,3E-09 | 1,6E-09 | 6,5E-10 |
| H4H12175P | 2,2E-09 | Не тестировали | 5,2E-09 | 4,2E-09 | >2,0E-08 (67%) |
| H4H12176P2 | 2,7E-09 | Не тестировали | 3,5E-09 | 2,1E-09 | 1,3E-09 |
| H4H12177P2 | 2,2E-09 | Не тестировали | 6,1E-09 | 2,4E-09 | 1,6E-09 |
| H4H12183P2 | 1,7E-09 | Не тестировали | 1,4E-08 | 1,2E-09 | 4,5E-10 |
| объект сравнения 1 | 2,3E-09 | 1,8E-09 | >9,0E-08 (49%) | Без ингибирования | Без ингибирования |
| Контрольное mAb 1 | Без ингибирования | Без ингибирования | Не тестировали | Не тестировали | Не тестировали |
| Контрольное mAb 2 | Не тестировали | Не тестировали | Без ингибирования | Без ингибирования | Без ингибирования |

*Если не указано иное, везде ингибирование составляет ~100%.

Как показано в табл. 16 и 17, все 25 антител против hC5 демонстрировали полное ингибирование CDC, опосредованной C5, присутствующим в 1,66% сыворотке человека. $IC_{50}$ для не мутированных антител находились в диапазоне от 1,2 до 3,4 нМ. $IC_{50}$ мутированных антител находились в диапазоне от 3,0 нМ до 12 нМ. Родительское не мутированное антитело H4H12166P давало полное ингибирование с $IC_{50}$ 2,6 нМ и 2,9 нМ.

Таблица 17

Ингибирование CDC мутированным антителом против hC5 с использованием 1,66% сыворотки и антитела против CD20 в клетках Daudi

| Сыворотка | Человек | Африканская зеленая мартышка | Истощенная по C5 человека и 6,6 нМ варианта C5 R885H | Истощенная по C5 человека и 6,6 нМ варианта C5 R885C |
|---|---|---|---|---|
| $EC_{50}$ [M] антитела против CD20 (с 1,66% сывороткой) | 1,9E-09 | 2,6E-09 | 6,3E-09 | 9,5E-09 |
| Постоянное антитело против CD20 (с 1,66% сывороткой) | 2 нМ | 10 нМ | 7 нМ | 30 нМ |
| Антитело | $IC_{50}$ [M] | $IC_{50}$ [M] (макс. % ингибирования)* | $IC_{50}$ [M] | $IC_{50}$ [M] |
| H4H12166P | 2,9E-09 | 5,6E-09 | 1,3E-09 | 7,6E-10 |
| H4H12166P2 | 3,7E-09 | 9,7E-09 | 1,7E-09 | 1,2E-09 |
| H4H12166P3 | 7,8E-09 | >3,0E-08 (64%) | 2,9E-09 | 1,7E-09 |
| H4H12166P4 | 3,5E-09 | 7,9E-09 | 1,5E-09 | 9,6E-10 |
| H4H12166P5 | 4,9E-09 | >3,0E-08 (75%) | 2,1E-09 | 1,4E-09 |
| H4H12166P6 | 3,0E-09 | 9,9E-09 | 1,3E-09 | 7,9E-10 |
| H4H12166P7 | 7,3E-09 | >6,0E-08 (61%) | 4,2E-09 | 2,3E-09 |
| H4H12166P8 | 4,1E-09 | >2,0E-08 (79%) | 2,1E-09 | 1,2E-09 |
| H4H12166P9 | 3,9E-09 | >1,0E-08 (85%) | 1,7E-09 | 7,7E-10 |
| H4H12166P10 | 1,2E-08 | >1,0E-07 (34%) | 7,0E-09 | 3,5E-09 |
| объект сравнения 1 | 2,7E-09 | >1,0E-07 (35%) | Без ингибирования | Без ингибирования |
| Контрольное mAb 2 | Без ингибирования | Без ингибирования | Без ингибирования | Без ингибирования |

*Если не указано иное, везде ингибирование составляет ~100%.

16 не мутированных антител против hC5 демонстрировали полное ингибирование CDC, опосредованной C5 африканской зеленой мартышки, с $IC_{50}$ в диапазоне от 2,0 нМ до 14 нМ.

4 из 9 мутированных антител демонстрировали полное ингибирование CDC, опосредованной C5 африканской зеленой мартышки, с $IC_{50}$ в диапазоне от 7,1 нМ до 9,9 нМ. Остальные 6 мутированных антител являются блокаторами с $IC_{50}$ больше 10 нМ и максимальным ингибированием (при 100 нМ антитела) в диапазоне от 34 до 85%. Родительское не мутированное антитело H4H12166P давало полное ингибирование с $IC_{50}$ 4,5 нМ и 5,6 нМ.

Для того чтобы тестировать, ингибируют ли антитела против hC5, варианты C5 человека, R885H и R885C, истощенную по C5 сыворотку человека тестировали с 6,6 нМ каждого варианта C5. Все 25 антител против hC5 демонстрировали полное ингибирование CDC, опосредованное вариантом C5 R885H, с $IC_{50}$ для не мутированных антител в диапазоне от 0,48 нМ до 4,2 нМ, тогда как $IC_{50}$ для мутированных антител находились в диапазоне от 1,3 нМ до 7,0 нМ. Родительское не мутированное антитело H4H12166P давало полное ингибирование с $IC_{50}$ 1,3 нМ и 1,3 нМ.

15 из 16 не мутированных антител против hC5 демонстрировали полное ингибирование CDC, опосредованной вариантом C5 R885C, с $IC_{50}$ в диапазоне от 0,43 нМ до 1,6 нМ. Одно не мутированное антитело демонстрировало слабое ингибирование CDC с максимальным ингибированием 67% (при 100 нМ антитела) и $IC_{50}$>20 нМ. Все 9 мутированных антител демонстрировали полное ингибирование CDC, опосредованной вариантом C5 R885C, с $IC_{50}$ в диапазоне от 0,77 нМ до 3,5 нМ. Родительское не мутированное антитело H4H12166P давало полное ингибирование с $IC_{50}$ 0,46 нМ и 0,76 нМ.

Антитело против CD20 демонстрировало CDC клеток Daudi с 1,66% сывороткой с $EC_{50}$ 1,0 нМ, 1,4 нМ и 1,9 нМ для сыворотки человека, 2,4 нМ и 2,6 нМ для сыворотки африканской зеленой мартышки, 1,9 нМ и 6,3 нМ для истощенной по hC5 сыворотки с вариантом hC5 R885H и 2,7 нМ и 9,5 нМ для истощенной по hC5 сыворотки с вариантом hC5 R885C. Ни одно из нерелевантных контрольных антител IgG, контрольного mAb1 и контрольного mAb2, не демонстрировало какое-либо ингибирование CDC.

Пример 7: ингибирование активности C5a, как определяют посредством люциферазного анализа.

В этом примере описан анализ для тестирования активации C5a через один из его рецепторов, C5aR1. C5aR1 представляет собой сопряженный с G-белком рецептор (GPCR) и может инициировать различные сопряженные с GPCR пути передачи сигнала (Monk et al. 2007, Br. J. Pharmacol. 152: 429-448). Создан биоанализ с использованием клеток HEK293, стабильно трансфицированных C5aR1 человека (№ доступа NP_001727.1) и Gα16 человека (№ доступа NP_002059.3) наряду с люциферазным репортером [отвечающий элемент NFAT (4X)-люцифераза]. Gα16 представляет собой относительно неразборчивый G белок, которые может связываться с GPCR различных типов, что ведет к активации PLC-β и последующему повышению $Ca^{++}$, который в свою очередь активирует транслокацию NFAT и транскрипцию репортерного гена (Kostenis et al. 2005, Trends Pharmacol. Sci. 26: 595-602). Результирующая клеточная линия HEK293/hGα16/hC5aR1/NFAT-luc выделена и поддерживается в 10% DMEM, содержащей 10% FBS, NEAA, пенициллин/стрептомицин, 500 мкг/мл G418, 100 мкг/мл гигромицина B и 7 мкг/мл бластицидина.

Для люциферазного биоанализа C5a клетки HEK293/hGα16/hC5aR1/NFAT-luc высевали в 96-луночные аналитические планшеты по 20000 клеток/лунка в OPTIMEM (Invitrogen, № 31985-070) с добавлением 0,5% BSA, пенициллина/стрептомицина и L-глутамин, и затем инкубировали при 37°C и 5% $CO_2$ в течение ночи. BSA использовали вместо FBS, поскольку показано, что сыворотка расщепляет и инактивирует hC5a (Klos et al., 2013, Pharmacol. Rev. 65: 500-543). На следующее утро hC5a титровали от 100 нМ до 2 пМ (включая контрольный образец, не содержащий hC5a) и добавляли в клетки для того, чтобы определять дозозависимую кривую титрования для клеточной линии. Для того чтобы тестировать ингибирование hC5a антителом к hC5a, 500 пМ hC5a добавляли к клеткам. Непосредственно после этого антитела, разведенные 1:3 от 100 нМ до 2 пМ (включая контрольный образец, не содержащий антитело), добавляли к клеткам. Клетки инкубировали в течение 5,5 ч при 37°C в присутствии 5% $CO_2$. Люциферазную активность обнаруживали после инкубации с реактивом OneGlo™ (Promega, №E6051). OneGlo™ представляет собой люминесцентный реактив, которым измеряют количество люциферазы, присутствующей в клетках. В этом анализе увеличенная активация hC5a ведет к увеличенному образованию люциферазы и люминесценции (измеряют в относительных световых единицах, RLU). Измерение люминесценции осуществляли с использованием прибора Victor X (Perkin Elmer). Результаты анализировали с использованием нелинейной регрессии (4-параметрической логистической) и программного обеспечения Prism 5 (GraphPad), чтобы получать значения $EC_{50}$ и $IC_{50}$. Ингибирование антител вычисляли так, что ингибирование от 0 до 100% представляет собой диапазон ингибирования от 500 пМ hC5a без ингибитора до 0 нМ hC5a.

Четыре антитела против hC5 тестировали на их способность ингибировать hC5a активацию его рецептора, hC5aR1, посредством измерения степени ингибирования для 500 пМ hC5a активации клеток HEK293/hGα16/hC5aR1/NFAT-luc.

Таблица 18

Ингибирование антителом против hC5 для 500 пМ hC5a в клетках HEK293/Gα16/hC5aR1/NFAT-luc

| $EC_{50}$[M] hC5a | 3,9E-10 |
|---|---|
| mAb PID или REGN № | Ингибирование для 500 пМ hC5a |
| | $IC_{50}$ [M] |
| H2aM11682N | 4,6E-10 |
| H2aM11684N | 3,5E-11 |
| H2aM11694N | 1,4E-10 |
| H2aM11695N | 4,2E-11 |
| Контрольное mAb | Без ингибирования |

Как показано в табл. 18, все 4 антитела по изобретению демонстрировали полное ингибирование для 500 пМ hC5a с $IC_{50}$ в диапазоне от 0,035 нМ до 0,46 нМ. Нерелевантное контрольное антитело IgG, контрольное mAb3, не демонстрировало какое-либо ингибирование hC5a. hC5a активировал клетки HEK293/Gα16/hC5aR1/NFAT-luc с $EC_{50}$ 0,39 нМ.

Пример 8: биоанализ гемолиза.

Анализ классического пути гемолиза (CH) и анализ альтернативного пути гемолиза (AH) разрабатывали для того, чтобы тестировать активность антител.

CH представляет собой скрининговый анализ активации классического пути комплемента, который чувствителен к снижению, отсутствию и/или неактивности любого компонента пути. В CH тестируют функциональную способность сывороточных компонентов классического пути комплемента лизировать красные клетки крови овцы (SRBC), предварительно покрытые антителом кролика против красных клеток крови овцы (гемолизин). Когда покрытые антителом SRBC инкубируют с тестовой сывороткой, ак-

тивируют классический путь комплемента и результатом является гемолиз. Если компонент комплемента отсутствует, CH уровень будет нулевым; если один или несколько компонентов классического пути снижены, CH будет снижен. (Nilsson et al 1984, J. Immunol. Meth. 72: 49-59). Этот анализ используют для определения характеристик и скрининга высокоаффинных антител против C5 человека.

Способы.

(A) Анализ гемолиза по классическому пути комплемента.

Желаемое число красных клеток крови овцы (SRBC) промывали в буфере GVB++ и ресуспендировали по $1\times10^9$ клеток/мл. Для сенсибилизации SRBC смешивали с равным объемом разведенного 1:50 гемолизина кролика против овцы (1,5 мг/мл) при 37°C в течение 20 мин. Сенсибилизированные клетки SRBC разводили до $2\times10^8$ клеток/мл в GVB++ перед использованием в анализе гемолиза. Нормальную сыворотку человека или сыворотку яванского макака разводили до 2% или 10% в буфере GVB++. Для того чтобы тестировать ингибирование опосредованной C5 гемолитической активности, тестовые антитела предварительно инкубировали в течение 20 мин при 4°C в концентрациях в диапазоне от 0,6 нМ до 800 нМ в 2-10% нормальной сыворотке человека или 10% сыворотке яванского макака или сыворотке африканской зеленой мартышки. Круглодонные 96-луночные планшеты использовали для того, чтобы измерять гемолитическую активность. Всего 100 мкл сенсибилизированных RBC овцы ($2\times10^8$ клеток/мл) высевали в 96-луночный планшет, после чего следовало добавление 100 мкл соответствующих образцов сыворотки, которые предварительно инкубировали с тестовыми антителами. Клетки аккуратно смешивали и инкубировали при 37°C в течение 60 мин. По истечении времени инкубации клетки осаждали центрифугированием при 1250×g и 4°C. Всего 100 мкл супернатанта переносили в свежий 96 плоскодонный планшет и считывали при 412 нм на считывателе микропланшетов Spectramax. Гемолитическую активность вычисляли при конечной концентрации в сыворотке 1-5% для обработок.

Процент гемолиза вычисляли следующим образом:

% гемолиза=100× (экспериментальный лизис клеток - фоновый лизис клеток)/(максимальный лизис клеток - фоновый лизис клеток).

В этом уравнении "фоновый лизис клеток" представляет собой OD при A412 нм от клеток, инкубированных в буфере GVB++, только не содержащем сыворотку. "Максимальный лизис клеток" представляет собой OD при A412 нм от клеток, которые обрабатывали водой. Результаты, выраженные в виде % гемолиза, анализировали с использованием нелинейной регрессии (4-параметрической логистической) и программного обеспечения Prism 5 (GraphPad) для получения значений $IC_{50}$. Данные представляли в виде среднего±стандартная ошибка среднего.

(B) Анализ альтернативного комплемента.

Желаемое число красных клеток крови кролика (RbRBC) промывали в буфере GVB-$Mg^{2+}$/EGTA и ресуспендировали по $2\times10^8$ клеток/мл. Нормальную сыворотку человека или сыворотку яванского макака разводили до 10% в буфере GVB-$Mg^{2+}$/EGTA. Для того чтобы тестировать ингибирование опосредованной C5 гемолитической активности, антитела в концентрациях в диапазоне от 3 нМ до 800 нМ предварительно инкубировали в течение 20 мин при 4°C в 5-10% нормальной сыворотке человека или сыворотке яванского макака. Круглодонные 96-луночные планшеты использовали для того, чтобы измерять гемолитическую активность. Всего 100 мкл RbRBC ($2\times10^8$ клеток/мл) высевали в 96-луночный планшет, после чего следовало добавление 100 мкл 10% нормальной сыворотки человека или сыворотки яванского макака или сыворотки африканской зеленой мартышки, которую предварительно инкубировали с антителами против C5. Клетки мягко перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 60 мин. По истечении времени инкубации клетки осаждали центрифугированием на 1250×g при 4°C. Всего 100 мкл супернатанта переносили в свежий 96 плоскодонный планшет и считывали при 412 нм на считывателе микропланшетов Spectramax. Гемолитическую активность вычисляли при конечной концентрации сыворотки 5% сыворотки.

Процент гемолиза вычисляли следующим образом:

% гемолиза=100× (экспериментальный лизис клеток - фоновый лизис клеток)/(максимальный лизис клеток - фоновый лизис клеток).

В этом уравнении "фоновый лизис клеток" представляет собой OD при A412 нм от клеток, которые инкубировали в буфере GVB-Mg/EGTA, не содержащем только сыворотку, или без какого-либо антитела против C5. "Максимальный лизис клеток" представляет собой OD при A412 нм от клеток, которые обрабатывали водой. Ингибирование посредством антител против C5, значения $IC_{50}$ вычисляли с использованием нелинейной регрессии (4-параметрической логистической) и программного обеспечения Prism 6 (GraphPad).

Результаты.

(A) Ингибирование гемолиза, опосредованного C5 человека.

Всего 25 антител против C5 человека (hC5), 16 не мутированных и 9 мутированных, тестировали на их способность ингибировать C5 из нормальной сыворотки человека (NHS) в анализе CH50 с использованием сенсибилизированных красных клеток крови овцы (SRBC) и анализе AH50 с использованием красных клеток крови кролика (RRBC).

Таблица 19

Ингибирование CP и AP активности антителом против hC5 в 1% или 5% нормальной сыворотке человека (NHS)

| mAb PID | CP человека | AP человека | CP человека | AP человека |
|---|---|---|---|---|
| | $IC_{50}$ [M] | $IC_{50}$ [M] | % макс. ингибирования | % макс. ингибирования |
| 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% |
| Изотипический контроль | Нет активности | Нет активности | Нет активности | Нет активности |

Как показано в табл. 19, 16 антител против hC5 по данному изобретению демонстрировали больше чем 94% ингибирование гемолиза по классическому пути (CP), опосредованному с помощью C5, присутствующего в 1% сыворотке человека. $IC_{50}$ для антител находились в диапазоне от 2,1 до 5,9 нМ и процент ингибирования находился в диапазоне 95-99%. Все 16 антител против C5 демонстрировали больше чем 60% ингибирование (за исключением H4H12169P) в анализе гемолиза по альтернативному пути (AP), который опосредован с помощью C5, присутствующего в 5% NHS. $IC_{50}$ для антител находились в диапазоне от 13 до 160 нМ и процент ингибирующей активности находился в диапазоне от 44 до 81%.

Таблица 20

Ингибирование CP и AP активности антителом против hC5 в 5% нормальной сыворотке человека (NHS)

| mAb PID | CP человека | AP человека | CP человека | AP человека |
|---|---|---|---|---|
| | $IC_{50}$ [M] | $IC_{50}$ [M] | % макс. ингибирования | % макс. ингибирования |
| 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 | Нет активности | 74,0% | Нет активности |
| Изотипический контроль | Нет активности | Нет активности | Нет активности | Нет активности |

Как показано в табл. 20, все 9 мутированных антител против hC5 демонстрировали ингибирование CP и AP гемолитической активности, опосредованной с помощью C5, присутствующего в 5% сыворотке человека. В анализе CP гемолиза родительское не мутированное антитело H4H12166P демонстрировало больше чем 98% ингибирование с $IC_{50}$ 10,9 нМ. 8 мутированных антител против hC5 демонстрировали больше чем 90% ингибирование с $IC_{50}$ в диапазоне от 10,3 нМ до 24,3 нМ. Мутированное антитело про-

тив C5 12166P10 демонстрировало частичное ингибирование 74%. В анализе АР гемолиза родительское не мутированное антитело H4H12166P демонстрировало больше чем 85% ингибирование с $IC_{50}$ 20,9 нМ. Мутированные антитела против hC5 демонстрировали ингибирование в диапазоне 72-83% и $IC_{50}$ антител находились в диапазоне от 28 нМ до 0,15 мкМ.

(B) Ингибирование гемолиза, опосредованного C5 обезьяны.

Всего 25 антител против C5 человека (hC5), 16 не мутированных и 9 мутированных, тестировали на их способность ингибировать C5 яванского макака и африканской зеленой мартышки в CH50 анализе с использованием сенсибилизированных красных клеток крови овцы (SRBC) и AH50 анализе с использованием красных клеток крови кролика (RRBC).

Таблица 21

Ингибирование CP и AP активности антителом против hC5 в 5% нормальных сыворотках африканской зеленой мартышки (AGM)

| | CP с AGM сывороткой | AP с AGM сывороткой | AGM CP | AGM AP |
|---|---|---|---|---|
| mAb PID | $IC_{50}$ [M] | $IC_{50}$ [M] | % макс. ингибирования | % макс. ингибирования |
| H4H12183P2 | Нет активности | Нет активности | Нет активности | Нет активности |
| 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 | Нет активности | 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% |

Как показано в табл. 21, антитела против hC5 демонстрировали различные уровни ингибирования CP или AP гемолитической активности в 5% сыворотках африканской зеленой мартышки. В CP анализе 2 из 16 антител против hC5 не демонстрировали ингибирование гемолитической активности. 14 антител демонстрировали ингибирование в диапазоне 43-94% с $IC_{50}$ в диапазоне от 25 нМ до 180 нМ. В анализе AP гемолиза, 13 из 17 антител демонстрировали ингибирование активность в диапазоне 17%-93% с $IC_{50}$ в диапазоне от 22,5 нМ до 233 нМ.

Таблица 22

Ингибирование CP и AP активности антителом против hC5 в 5% нормальных сыворотках обезьян Cynomolgus (Cyno)

| | CP с сывороткой Cyno | AP с сывороткой Cyno | Cyno CP | Cyno AP |
|---|---|---|---|---|
| mAb PID | $IC_{50}$ [M] | $IC_{50}$ [M] | % макс. ингибирования | % макс. ингибирования |
| 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% |
| Изотипический контроль | Нет активности | Нет активности | Нет активности | Нет активности |

Как показано в табл. 22, антитела против hC5 (за исключением H4H12183P2, которое демонстрировало 64% ингибирование CP) демонстрировали больше чем 90% ингибирование в анализе CP или AP гемолиза в 5% сыворотке яванского макака. В анализе CP гемолиза $IC_{50}$ антител находились в диапазоне от 7,15 нМ до 142 нМ. В анализе AP гемолиза $IC_{50}$ антител находились в диапазоне от 5,4 до 29,6 нМ. (C) Ингибирование гемолиза, опосредованного вариантом C5 человека Выбранные антитела против C5 тестировали на их способность ингибировать вариант C5 человека (см. пример 3 в настоящем описании) из истощенной по C5 сыворотки человека в CH50 анализе. В истощенной по C5 сыворотке человека с добавлением экзогенного варианта C5 R885H, H4H12166P и объект сравнения 2 блокировали CP гемолиз со значениями $IC_{50}$ 6,0 нМ и 4,4 нМ, соответственно, и значениями $IC_{80}$ 7,6 нМ и 5,5 нМ, соответственно. Для варианта R885C, H4H12166P и объект сравнения 2 блокировали CP гемолиз в истощенной по C5 сыворотке человека с экзогенными вариантами C5 с $IC_{50}$ 9,3 нМ и 6,8 нМ, соответственно, и значениями $IC_{80}$ 11 нМ и 8,2 нМ, соответственно. Как ожидали, объект сравнения 1 не блокировал гемолитическую активность вариантов C5 человека.

(D) Ингибирование комплекса C5b-6 человека.

Выбранные антитела против C5 тестировали на их способность ингибировать комплекс C5b-6 человека из истощенной по C5 сыворотки человека в CH50 анализе. H4H12166P сильно блокировало CP гемолиз в истощенной по C5 сыворотке человека с добавлением экзогенного комплекса huC5b-6 с $IC_{50}$ 3,8 нМ и значением $IC_{80}$ 5,8 нМ. В отличие от этого, объект сравнения 1 блокировал опосредованный комплексом C5b-6 гемолиз с меньшей силой, со значениями $IC_{50}$ 5,0 нМ и значением $IC_{80}$ 46 нМ, соответственно. Объект сравнения 1 ингибировал только 70% общего гемолиза при наивысших тестируемых концентрациях. Объект сравнения 2 не блокировал гемолитическую активность комплекса C5b-6 человека.

Пример 9: антитела против C5 блокируют образование C5a в анализе CP гемолиза.

Для того чтобы оценивать, ингибируют ли антитела против C5 образование C5a, супернатанты из анализа классического пути (CP) гемолиза анализировали на уровни C5a с помощью ELISA.

C5a, образуемый в результате расщепления C5, представляет собой белковый фрагмент из 74 аминокислот. C5a быстро метаболизируется карбоксипептидазами сыворотки до более стабильной менее активной формы из 73 аминокислот C5a des-Arg посредством удаления C-концевого аргинина. Количественное определение C5a des-Arg, следовательно, обеспечивает надежное измерение для мониторинга образования C5a in vivo и in vitro. В соответствии с информацией, предоставляемой производителем, используемый здесь набор MicroVue C5a ELISA позволяет обнаруживать C5a des-Arg. Предварительные эксперименты (данные не приведены) показывают, что также обнаруживают первичную форму C5a из 74

аминокислот. В целях этого примера обе формы в совокупности обозначают как "C5a".

Уровни белка C5a определяли в супернатантах из анализа CP гемолиза с использованием нормальной сыворотки человека (NHS) с сохраненным комплементом, которую предварительно инкубировали с H4H12166P или изотипическим контрольным антителом, как описано в примере 8. Уровни белка C5a измеряли с использованием набора MicroVue C5a ELISA по инструкциям производителя. В кратком изложении, образцы разводили и инкубировали в планшетах, предварительно покрытых захватывающим антителом (мышиным против C5a со специфичностью к нео-эпитопу на C5 человека). Белок C5a человека, предоставленный производителем, использовали в качестве стандарта для калибровки. C5a в супернатантах обнаруживали посредством HRP-конъюгированного идентифицирующего антитела (моноклональное антитело мыши к области C5a из C5). Хромогенный субстрат HRP 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB) добавляли для того, чтобы обнаруживать активность HRP. Использовали раствор 1 H соляной кислоты для того, чтобы останавливать реакцию, и измеряли оптическую плотность при 450 нм (OD450) на считывателе планшетов SpectraMax. Данные анализировали с использованием нелинейной регрессии (4-параметрическая логистическая) в GraphPad Prism. Концентрацию C5a выражали в нг/мл супернатанта.

В анализе с использованием 5% NHS, H4H12166P сильно блокировал увеличение уровней белка C5a в зависимости от дозы с $IC_{50}$ 8,5 нМ, тогда как изотипическое контрольное антитело не оказывало эффекта на уровни C5a (фиг. 1). Максимальное блокирование при наивысшей тестированной концентрации H4H12166P (267 нМ) вело к ~10-кратному снижению уровней C5a до 3,8 нг/мл (0,3 нМ) по сравнению с 34 нг/мл (2,8 нМ), которые наблюдали при наименьшей тестированной концентрации H4H12166P (1 нМ) в 5% сыворотке. Концентрация C5a, которую наблюдали для максимального блокирования, близка к базовому уровню C5a 2,3 нг/мл (0,2 нМ) в необработанной 5% NHS.

Пример 10: определение характеристик фармакокинетики и фармакодинамики антител против C5 у яванского макака.

В этом примере описано определение характеристик фармакокинетики (PK) и фармакодинамики (PD) выбранных антител против C5, которое проводили у самцов яванского макака. Эндогенные уровни C5 определяли перед дозированием антитела против C5 и использовали для стратификации групп животных по дозе.

Общие циркулирующие уровни C5 у яванского макака определяли с использованием Human Complement C5 ELISA (Abcam, № по каталогу ab125963), который осуществляли в соответствии с рекомендациями производителя. Определяли, что усредненные концентрации белка C5 у обезьян составляют 90,85 мкг/мл±19,17 мкг/мл.

Для каждого антитела против C5, каждому из 4 яванских макаков вводили одну внутривенную (IV) инъекцию в дозе 15 мг/кг. Образцы крови брали у каждого животного перед дозой и до 1680 ч (70 суток), получали сыворотку и замораживали при -80°C до анализа на PK и PD.

Анализ общего уровня антител IgG с помощью иммунологического анализа ELISA.

Общие концентрации антител в образцах сыворотки обезьяны измеряли с использованием не валидированного прямого ELISA. В процедуре ELISA использовали микротитровальный планшет, покрытый моноклональным антителом мыши против Fc IgG1/IgG4 человека. В планшет различные антитела против C5 добавляли и антитела против C5, захваченные на планшете, обнаруживали с использованием биотинилированного моноклонального антитела мыши против Fc IgG4 человека, после чего следовал нейтравидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (нейтравидин-HRP). Затем добавляли субстрат на основе люминола со специфичностью к пероксидазе, чтобы получать интенсивность сигнала, которая пропорциональна концентрации общего захваченного антитела против C5. Измерения калибровочных стандартов в относительных световых единицах (RLU) и соответствующие им номинальные концентрации аппроксимировали с использованием взвешенного 4-параметрического логистического уравнения для того, чтобы создавать калибровочное уравнение, которое описывает зависимость концентрации антител против C5 и ответа в анализе. Нижний предел количественного определения (LLOQ) составлял 1,56 нг/мл в анализе (2% сыворотка обезьяны) и 78 нг/мл в чистой сыворотке обезьяны.

Определение PK параметров.

PK параметры определяли посредством некомпартментного анализа (NCA) с использованием программного обеспечения Phoenix®WinNonlin® (версия 6.4, Certara, L.P.) и модели IV болюсного дозирования.

Все PK параметры получали из соответствующих средних значений концентраций, в том числе наблюдаемой максимальной концентрации в сыворотке ($C_{max}$), времени наблюдаемой пиковой концентрации ($t_{max}$) и наблюдаемого оценочного времени полужизни ($T_{1/2}$). Для каждого антитела площадь под кривой зависимости концентрации от времени вплоть до последней измеряемой концентрации ($AUC_{last}$) и экстраполированную от нулевого момента времени до бесконечности ($AUC_{inf}$) определяли с использованием правила линейных трапеций с линейной интерполяцией и равномерными весами.

PD анализ посредством анализа гемолиза ex vivo.

Фармакодинамику выбранных антител против C5 анализировали с использованием анализов клас-

сического пути и альтернативного пути гемолиза ex vivo.

Анализ классического пути гемолиза: красные клетки крови овцы (SRBC) промывали в буфере GVB++ (желатин-вероналовый буфер с $CaCl_2$ и $MgCl_2$) (Boston BioProducts) и ресуспендировали по $1\times10^9$ клеток/мл. Чтобы сенсибилизировать SRBC, всего $1\times10^9$ SRBC/мл смешивали с равным объемом разведенного 1:50 гемолизин кролика против овцы (1,5 мг/мл) при 37°C в течение 20 мин. Сенсибилизированные SRBC разводили до $2\times10^8$ клеток/мл в буфере GVB++ перед использованием в анализе гемолиза. Кровь у яванских макаков брали перед дозированием и через 5 мин, 4 и 8 ч и 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 18, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 и 70 суток после дозы для PD анализа. Сыворотку получали и замораживали до дальнейшего использования. В сутки анализа сыворотку Cynomolgus из соответствующих моментов времени разводили до 10% в буфере GVB++. Круглодонные 96-луночные планшеты использовали для того, чтобы измерять гемолитическую активность. Всего 100 мкл сенсибилизированных SRBC ($2\times10^8$ клеток/мл) высевали в 96-луночный планшет при 37°C, после чего следовало добавление 100 мкл 10% сыворотки яванского макака из соответствующих моментов времени. SRBC мягко перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 10 мин. По истечении времени инкубации клетки центрифугировали на 1250×g при 4°C. Всего 100 мкл супернатанта переносили в свежий 96 плоскодонный планшет и считывали при 412 нм на считывателе микропланшетов Spectramax. Гемолитическую активность вычисляли при конечной концентрации сыворотки 5%. Процент гемолиза вычисляли с использованием значений поглощения и следующего уравнения:

% гемолиза =100× (экспериментальный лизис клеток - фоновый лизис клеток)/(максимальный лизис клеток - фоновый лизис клеток).

В этом уравнении "фоновый лизис клеток" представляет собой OD при A412 нм для SRBC, которые инкубировали в буфере GVB++, только не содержащем сыворотку. "Максимальный лизис клеток" представляет собой OD при A412 нм для SRBC, которые обрабатывали водой. Результаты, выраженные в виде % гемолиза, анализировали с использованием нелинейной регрессии (4-параметрической логистической) и программного обеспечения Prism 5 (GraphPad) для получения значений $IC_{50}$.Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего.

Анализ альтернативного пути гемолиза: желаемое число красных клеток крови кролика (RbRBC) промывали в буфере GVB-$Mg^{2+}$/EGTA и ресуспендировали по $2\times10^8$ клеток/мл. Кровь у яванских макаков брали перед дозированием и через 5 мин, 4 и 8 ч и 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 18, 21, 28, 35, 42 и 49 суток после дозы для PD анализа. Сыворотку получали и замораживали до дальнейшего использования. Круглодонные 96-луночные планшеты использовали для того, чтобы измерять гемолитическую активность. Всего 100 мкл RbRBC ($2\times10^8$ клеток/мл) высевали в 96-луночный планшет при 37°C, после чего следовало добавление 100 мкл 10% сыворотки яванского макака из соответствующих моментов времени, перечисленных выше. RbRBC мягко перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 60 мин. По истечении времени инкубации, клетки центрифугировали на 1250×g при 4°C. Всего 100 мкл супернатанта переносили в свежий 96 плоскодонный планшет, который считывали при 412 нм на считывателе микропланшетов Spectramax. Гемолитическую активность вычисляли для конечной концентрации в сыворотке 5% и выражали в виде процентной доли от общего гемолиза RBC с использованием воды. Процент гемолиза вычисляли как описано выше.

Результаты.

Выбранные антитела против C5 (перечислено в табл. 1) тестировали в начальных экспериментах на пролонгированные фармакокинетические профили у яванского макака и C5-гуманизированных мышей (описано в примере 10). H4H12166P и H4H12161P отбирали в качестве обладающих высокой аффинностью в сочетании с пролонгированной PK и использовали в последующих экспериментах в настоящем описании с объектом сравнения 1 и объектом сравнения 2.

Яванским макакам вводили одну 15 мг/кг IV болюсную дозу H4H12166P, H4H12161P или объекта сравнения 2. Концентрации всех антител в сыворотке и процент активности классического пути (CP) гемолиза определяли в 19 моментов времени в течение 70-суточного прижизненного периода. Альтернативный путь (AP) гемолиза определяли в 17 моментов времени в течение 50-суточного прижизненного периода. В табл. 23 сведены средние концентрации антител для всех 3 антител. Профили средних общих концентраций антител в зависимости от времени приведены на фиг. 2. Средние параметры PK описаны в табл. 24.

Таблица 23

Средние концентрации общего IgG в сыворотке после одной 15 мг/кг внутривенной инъекции выбранных антител против C5 самцам яванского макака

| Время (часы после дозы) | № | Концентрация Ab в сыворотке (мкг/мл) среднее ± SD | | |
|---|---|---|---|---|
| | | H4H12166P | H4H12161P | объект сравнения 2 |
| 0 | 4 | BLQ | BLQ | BLQ |
| 0,083 | 4 | 445 ± 30 | 456 ± 26,2 | 459 ± 55,2 |
| 4 | 4 | 328 ± 27 | 360 ± 28,2 | 363 ± 43,8 |
| 8 | 4 | 353 ± 29,9 | 316 ± 21,5 | 357 ± 16,1 |
| 24 | 4 | 282 ± 43,6 | 276 ± 32,4 | 248 ± 19,6 |
| 48 | 4 | 225 ± 15,2 | 221 ± 21,5 | 212 ± 19,3 |
| 72 | 4 | 180 ± 15,0 | 181 ± 17,2 | 196 ± 36,2 |
| 120 | 4 | 194 ± 20,9 | 162 ± 10,7 | 179 ± 23,3 |
| 168 | 4 | 171 ± 29,9 | 132 ± 17,0 | 157 ± 18,4 |
| 240 | 4 | 157 ± 12,7 | 96,1 ± 17,3 | 114 ± 13,0 |
| 336 | 4 | 120 ± 10,2 | 49,3 ± 18,7 | 67,9 ± 25,8 |
| 432 | 4 | 105 ± 13,9 | 24,6 ± 11,8 | 42,6 ± 15,9 |
| 504 | 4 | 92,2 ± 10,6 | 13,8 ± 9,95 | 28,6 ± 13,1 |
| 672 | 4 | 75,1 ± 15,8 | 6,16 ± 2,40 | 10,9 ± 6,25 |
| 840 | 3 | 59,6 ± 4,79 | 2,44 ± 0,85 | 4,45 ± 2,63 |
| 1008 | 3 | 43,3 ± 2,89 | 1,16 ± 0,52 | 2,17 ± 1,58 |
| 1176 | 3 | 30,6 ± 1,42 | 0,57 ± 0,25 | 1,29 ± 1,16 |
| 1344 | 3 | 25,9 ± 3,74 | 0,315 ± 0,16 | 0,492 ± 0,49 |
| 1512 | 3 | 18,2 ± 2,41 | 0,17 ± 0,08 | 0,270 ± 0,27 |
| 1680 | 3 | 11,5 ± 1,51 | 0,079 ± 0,07 | 0,123 ± 0,15 |

Время - время в часах после инъекции одной дозы; SD - стандартное отклонение; BLQ - ниже предела количественного определения.

После IV введения болюса определяли характеристики профилей зависимости концентрации общих IgG от времени для H4H12166P, H4H12161P и объекта сравнения 2 с помощью начальной короткой фазы распределения, после которой следует одна фаза элиминции на всем протяжении прижизненного периода. Пиковые концентрации H4H12166P, H4H12161P и объекта сравнения 2 хорошо поддавались сравнению, поскольку соответствующие значения $C_{max}$/дозы среди всех антител находились в пределах 1,1 раза (29,7, 30,4 и 30,6 [(мкг/мл)/(мг/кг)], соответственно) (табл. 24).

Таблица 24

Средние фармакокинетические параметры для концентраций общих IgG в сыворотке после одной внутривенной инъекции выбранных антител против C5 15 мг/кг самцам яванского макака

| Параметр | H4H12166P | | H4H12161P | | Объект сравнения 2 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 15 мг/кг IV (n=4) | | | | | |
| | Среднее | SD | Среднее | SD | Среднее | SD |
| $C_{max}$ (мкг/мл) | 445 | 30,0 | 456 | 26,2 | 459 | 55,2 |
| Cmax/доза (мкг/мл)/(мг/кг) | 29,7 | 2,00 | 30,4 | 1,75 | 30,6 | 3,68 |
| $C_0$ (мкг/мл) | 448 | 30,5 | 458 | 26,6 | 461 | 55,6 |
| $t_{max}$ (часы) | 0,083 | 0 | 0,083 | 0 | 0,083 | 0 |
| $AUC_{last}$ сутки×(мкг/мл) | 5080 | 1040 | 2350 | 357 | 2810 | 470 |
| $AUC_{last}$/доза сутки× (мкг/мл)/(мг/кг) | 339 | 69,3 | 157 | 23,8 | 187 | 31,3 |
| $AUC_{inf}$ сутки× (мкг/мл) | 5550 | 671 | 2350 | 356 | 2810 | 470 |
| $AUC_{inf}$/доза сутки× (мкг/мл)/(мг/кг) | 370 | 44,7 | 157 | 23,7 | 188 | 31,4 |
| CL (мл/ч/кг) | 0,114 | 0,0143 | 0,270 | 0,0411 | 0,228 | 0,0425 |
| $V_{ss}$ (мл/кг) | 60,4 | 4,85 | 44,0 | 4,34 | 45,3 | 3,06 |
| $t_{1/2}$ (сутки) | 15,6 | 1,43 | 5,50 | 2,45 | 5,91 | 1,13 |

IV - внутривенно; n - число животных; $C_{max}$ - пиковая концентрация; $C_0$ - начальная концентрация, определяемая посредством экстраполяции; $t_{max}$ - время до $C_{max}$; AUC -площадь под кривой концентрации-времени; $AUC_{last}$ - AUC, вычисленная от нулевого момента времени до времени последней положительной концентрации; $AUC_{inf}$ - AUC от нулевого момента времени и экстраполированная до бесконечности; CL - общий клиренс организма; $V_{ss}$ - объем распределения в устойчивом состоянии; $t_{1/2}$ - время полужизни; SD - стандартное отклонение.

Note: $t_{max}$ выражают в номинальных часах.

Оценка профилей концентрация-время показывала, что H4H12166P демонстрировало самую медленную элиминцию с конечными концентрациями антител ≥10 мкг/мл до суток 71 исследования. Кинетика у H4H12161P и объекта сравнения 2 была схожей; оба демонстрировали более быструю элиминцию, чем H4H12166P, с концентрациями mAb≥10 мкг/мл к суткам 22 и 29, соответственно.

Следовательно, нормализованные по дозе экспозиции ($AUC_{last}$/доза) показывали, что H4H12166P имело самую высокую экспозицию 339 суток × (мкг/мл)/(мг/кг), тогда как H4H12161P и объект сравнения 2 имели приблизительно в 2 раза меньшую экспозицию, 157 и 187 суток × (мкг/мл)/(мг/кг), соответственно, чем H4H12166P.

Время полужизни антитела ($t_{1/2}$), вычисленное во время фазы элиминции, находилось в диапазоне от 5,5 до 15,6 суток среди групп доз и также коррелировало с экспозицией, где H4H12166P имело, соответственно, самое высокое $t_{1/2}$ 15,6 суток, тогда как H4H12161P и объект сравнения 2 имели значения $t_{1/2}$ 5,5 и 5,9 суток, соответственно.

Фармакологические эффекты антител против C5 из образцов сыворотки яванского макака определяли ex vivo посредством гемолиза по классическому пути комплемента (CP) с использованием сенсибилизированных красных клеток крови овцы (SRBC) и альтернативного пути (AP) гемолиза красных клеток крови кролика (RbRBC). Ингибирование гемолитической активности вычисляли для конечной концентрации в сыворотке 5% и выражали в виде процентной доли общего гемолиза RBC с использованием воды. В табл. 25 сведена активность 3 антител ex vivo, как определяют по среднему проценту гемолиза.

Таблица 25
Процент активности гемолиза по классическому и альтернативному пути ex vivo для выбранных антител против C5

| Время (часы после дозы) | № | % классического пути гемолиза в сыворотке Cynomolgus, 10 мин, среднее ± SEM | | | % альтернативного пути гемолиза в сыворотке Cynomolgus, 60 мин, среднее ± SEM | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | H4H12166P | H4H12161P | объект сравнения 2 | H4H12166P | H4H12161P | объект сравнения 2 |
| 0 | 4 | 91,34 ± 7,6 | Не тестировали | 84,36 ± 20,28 | 73,44 ± 17,26 | 64,90 ± 19,51 | 55,77 ± 10,82 |
| 0,083 | 4 | 3,5 ± 1,4 | Не тестировали | 6,6 ± 6,5 | 5,53 ± 1,98 | 5,90 ± 3,92 | 3,83 ± 3,93 |
| 4 | 4 | 2,35 ± 1,06 | Не тестировали | 3,16 ± 2,2 | 7,43 ± 2,54 | 6,53 ± 2,7 | 5,30 ± 2,80 |
| 8 | 4 | 1,55 ± 0,21 | Не тестировали | 1,25 ± 0,21 | 3,53 ± 0,91 | 4,70 ± 2,77 | 1,98 ± 0,83 |
| 24 | 4 | 7,7 ± 6,08 | Не тестировали | 4,55 ± 2,05 | 13,40 ± 2,77 | 4,68 ± 1,89 | 4,65 ± 2,35 |
| 48 | 4 | 2,85 ± 2,19 | Не тестировали | 2,6 ± 0,7 | 5,53 ± 2,40 | 7,68 ± 5,22 | 2,28 ± 0,67 |
| 72 | 4 | 0,9 ± 0,42 | Не тестировали | 1,3 ± 0,28 | 7,95 ± 3,36 | 5,95 ± 2,23 | 1,45 ± 0,33 |
| 120 | 4 | 1,75 ± 0,07 | Не тестировали | 1,3 ± 0,14 | 16,38 ± 6,91 | 7,60 ± 1,94 | 1,68 ± 0,22 |
| 168 | 4 | 1,6 ± 1,13 | Не тестировали | 1,4 ± 0,56 | 21,28 ± 8,24 | 10,75 ± 2,27 | 2,15 ± 0,19 |
| 240 | 4 | 1 ± 0,14 | Не тестировали | 3,7 ± 2,83 | 19,18 ± 10,20 | 13,53 ± 7,17 | 14,20 ± 16,73 |
| 336 | 4 | 2,55 ± 2,05 | Не тестировали | 37,85 ± 5,3 | 21,10 ± 7,55 | 50,58 ± 12,91 | 65,60 ± 26,04 |
| 432 | 4 | 1,35 ± 0,91 | Не тестировали | 105,25 ± 3,3 | 15,20 ± 10,86 | 59,75 ± 12,65 | 54,55 ± 19,11 |
| 504 | 4 | 3,55 ± 2,05 | Не тестировали | 107,1 ± 4,38 | 33,15 ± 8,80 | 88,55 ± 24,63 | 85,63 ± 27,48 |
| 672 | 4 | 2,2 ± 0,56 | Не тестировали | 88,9 ± 23,05 | 75,25 ± 18,30 | 88,55 ± 8,53 | 91,58 ± 18,55 |
| 840 | 3 | 3,075 ± 2,70 | Не тестировали | 105,37 ± 53,4 | 46,65 ± 5,30 | 92,33 ± 5,16 | 91,85 ± 2,33 |
| 1008 | 3 | 15,5 ± 26,6 | Не тестировали | 108,85 ± 2,35 | 58,60 ± 9,48 | 92,45 ± 6,27 | 92,30 ± 2,69 |
| 1176 | 3 | 58,33 ± 39,55 | Не тестировали | 113,85 ± 2,62 | 72,95 ± 5,87 | 104,90 ± 3,5 | 101,90 ± 0,42 |
| 1344 | 3 | 71,55 ± 43,02 | Не тестировали | 110,3 ± 1,98 | Не тестировали | Не тестировали | Не тестировали |
| 1512 | 3 | 91,375 ± 29,7 | Не тестировали | 110,6 ± 0,85 | Не тестировали | Не тестировали | Не тестировали |
| 1680 | 3 | 112,22 ± 4,06 | Не тестировали | 112,15 ± 0,5 | Не тестировали | Не тестировали | Не тестировали |

Время - время в часах после инъекции одной дозы; SEM - стандартная ошибка среднего; BLQ - ниже предела количественного определения; NC - не вычисляли.

Как показано в табл. 25 и на фиг. 2, PD эффекты измеряли с помощью CP комплемента (инкубация 10 мин) к суткам 70. H4H12166P блокировало больше чем 95% CP гемолитической активности до суток 35. Активность возвращалась к максимальным уровням гемолиза до исследования к суткам 70. Объект сравнения 2 блокировал приблизительно 95% CP гемолитической активности до суток 10, и активность быстро возвращалась к максимальным уровням гемолиза до исследования к суткам 18.

PD эффекты также измеряли посредством анализа гемолиза по AP пути комплемента (инкубация 60 мин) до суток 49. Как показано в табл. 25 и на фиг. 3, H4H12166P блокировало 80% общей AP гемолитической активности до суток 18, и активность возвращалась к максимальному уровню гемолиза до исследования к суткам 50. H4H1216P и объект сравнения 2 блокировали 90% AP гемолитической активности до суток 7, и активность возвращалась к максимальным уровням гемолиза до исследования к суткам 21.

Пример 11: определение характеристик PK/PD для антител против C5 у C5-гуманизированных мышей.

В этой группе экспериментов фармакокинетику и фармакодинамику выбранных антител против C5 оценивали у мышей, гуманизированных для того, чтобы экспрессировать белок C5 человека с использованием технологии Velocigene® (Valenzuela et al 2003, Nat. Biotechnol. 21: 652-659). Создавали гуманизированных мышей с заменой экзонов 2-41 гена C5 мыши на экзоны 2-42 гена C5 человека (раскрыто в публикации патентной заявки США 2015/0313194, включенной в настоящее описание в полном объеме).

Общие уровни циркулирующего C5 человека определяли с использованием Human Complement C5 ELISA (Abcam, № по каталогу ab125963), который осуществляли в соответствии с рекомендациями производителя.

Определение общего уровня лекарственного средства в сыворотке с помощью ELISA.

Концентрации циркулирующих антител против C5, как связанных с C5, так и не связанных, определяли по анализ общих антител человека с использованием ELISA.

В кратком изложении, поликлональное антитело козы против IgG человека 1 мкг/мл в PBS иммобилизовали на 96-луночных планшетах в течение ночи; планшеты промывали для того, чтобы удалять не связанный IgG и затем блокировали с использованием 5% BSA. Серийные разведения образцов сыворотки, содержащей антитела против C5, (6 точек) и эталонные стандарты (12 точек) для соответствующих антител переносили в планшеты, покрытые против IgG человека, и инкубировали в течение одного ч. Затем связанные с планшетом антитела против C5 обнаруживали с использованием поликлонального антитела козы против IgG человека, конъюгированного с пероксидазой хрена. Планшеты проявляли с использованием субстрата TMB в соответствии с рекомендованным протоколом производителя, и сигналы оптической плотности (OD) при 450 нм регистрировали с использованием считывателя планшетов Perkin Elmer Victor X4 Multimode. Концентрации антител против C5 в сыворотке вычисляли на основе калибровочной кривой эталонных стандартов, созданной с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

Определение PK параметров.

PK параметры определяли с использованием некомпартментного анализа (NCA) и программного обеспечения Phoenix®WinNonlin® (версии 6.3, Certara, L.P.) и модель внесосудистого дозирования. Используя соответствующие средние значения концентраций для каждого антитела, все PK параметры, в том числе наблюдаемое оценочное время полужизни ($t_{1/2}$) и площадь под кривой зависимости концентрации от времени вплоть до последней измеряемой концентрации ($AUC_{last}$), определяли с использованием правила линейных трапеций с линейной интерполяцией и равномерными весами.

PD анализ посредством анализа гемолиза.

Фармакодинамику для выбранных антител против C5 определяли с использованием анализа гемолиза по классическому пути комплемента. Красные клетки крови овцы (SRBC) (кровь овцы в растворе Олсвера) промывали в буфере GVB++ (желатин-вероналовый буфер с $CaCl_2$ и $MgCl_2$) (Boston BioProducts) и ресуспендировали по $1\times10^9$ клеток/мл. Для сенсибилизации $1\times10^9$ SRBC/мл смешивали с равным объемом разведенного 1:50 гемолизина кролика против овцы (1,5 мг/мл) при 37°C в течение 20 мин. Сенсибилизированные SRBC разводили до $2\times10^8$ клеток/мл в GVB++ перед использованием в анализе гемолиза. Образцы сывороток от получавших предварительные дозы животных или гуманизированных C5 мышей, которым дозировали антитела против C5, которые брали в сутки 10, 20, 30, 40 и 50 после дозы, разводили до 20% в буфере GVB++. Всего 100 мкл сенсибилизированных SRBC ($2\times10^8$ клеток/мл) высевали в 96-луночные круглодонные планшеты при 37°C, после чего следовало добавление 100 мкл 20% сыворотки, в которую добавляли 160-180 мкг/мл белка 3 комплемента человека (huC3). Клетки мягко перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После инкубации клетки центрифугировали на 1250×g при 4°C. Всего 100 мкл супернатанта переносили в свежий 96 плоскодонный планшет и считывали на A412 нм в считывателе микропланшетов Spectramax. Процент гемолиза вычисляли с использованием значений поглощения и следующего уравнения:

% гемолиза =100× (экспериментальный лизис клеток - фоновый лизис клеток)/(максимальный ли-

зис клеток - фоновый лизис клеток).

В этом уравнении "фоновый лизис клеток" представляет собой OD при A412 нм от SRBC, которые инкубировали в буфере GVB++, только не содержащем сыворотку. "Максимальный лизис клеток" представляет собой OD при A412 нм от SRBC, которые обрабатывали водой. Результаты, выраженные в виде % гемолиза, анализировали с использованием нелинейной регрессии (4-параметрическая логистическая) в программном обеспечении Prism 6 (GraphPad) для получения значений $IC_{50}$. Данные представлены в виде среднего+стандартная ошибка среднего.

Эксперимент 1.

В этом эксперименте фармакокинетику и фармакодинамику образцового антитела H4H12166P оценивали в сравнении с объектом сравнения 1 и объектом сравнения 2 у гуманизированных C5 мышей. Общие уровни циркулирующего C5 человека определяли с использованием Human Complement C5 ELISA (Abcam, № по каталогу ab125963), который осуществляли в соответствии с рекомендациями производителя. Определяли, что усредненные концентрации C5 человека у мышей составляют 39,73 мкг/мл±17,82 мкг/мл. Имело место различие между самцами (55,4±1,7 мкг/мл, n=47) и самками (24,7±0,6 мкг/мл, n=49) мышей.

Перед дозированием антител самцов и самок гуманизированных C5 мышей стратифицировали в соответствии с уровнями C5 человека, которые усредненно составляли 40 мкг/мл. Для каждого антитела против C5, когорты из 22 мышей получали одну дозу H4H12166P, объекта сравнения 1 или объекта сравнения 2 15 мг/кг посредством подкожной (s.c.) инъекции. У всех мышей брали кровь перед дозой и в сутки 1 после инъекции для PK анализа. Кроме того, через 10, 20, 30, 40 и 50 суток после инъекции группы из 4 или 5 мышей из каждой когорты умерщвляли и собирали терминльный образцы крови для PK и PD анализа. Образцы сыворотки в сутки 1 представляли собой среднее для всей когорты из 22 мышей. Из крови получали сыворотку и замораживали ее при -80°C до анализа.

Общие концентрации антител определяли в 7 моментов времени и процент активности гемолиза определяли в 6 моментов времени за 50-суточный прижизненный период. Все концентрации антител против C5 сведены в табл. 26. Профили средних общих концентраций антител в зависимости от времени приведены на фиг. 4. Средние PK параметры описаны в табл. 27.

Таблица 26

Средние концентрации общего IgG в сыворотке после одной подкожной инъекции антител против C5 15 мг/кг гуманизированным C5 мышам

| Время (сутки) | № | Концентрация Ab в сыворотке (мкг/мл) среднее ± SD | | |
|---|---|---|---|---|
| | | H4H12166P | Объект сравнения 1 | Объект сравнения 2 |
| 1 | 22 | 178 ± 22,7 | 229 ± 40,7 | 164 ± 24,1 |
| 10 | 4 | 83,7 ± 22,2 | 102 ± 22,9 | 44 ± 24,1 |
| 20 | 5 | 57,1 ± 26,8 | 29 ± 31,3 | 11,4 ± 10,3 |
| 30 | 5 | 38,1 ± 7,6 | 30,1 ± 34,2 | 3,6 ± 3,2 |
| 40 | 4 | 11,9 ± 5,0 | 0,4 ± 0,4 | 0,5 ± 0,4 |
| 50 | 4* | 9,3 ± 12,2 | 0,3 ± 0,3 | 0,3 ± 0,2 |

Время - время в часах после инъекции одной дозы; сутки - сутки исследования; SD - стандартное отклонение; SEM - стандартная ошибка среднего; ND - не обнаруживали; NS - нет образцов. *Для объекта сравнения 2 в сутки 50 n=3 из-за невозможности анализа одного образца в силу технических проблем.

Таблица 27

PK параметры

| Параметр | Единицы | H4H12166P | Объект сравнения 1 | Объект сравнения 2 |
|---|---|---|---|---|
| Концентрация mAb в сутки 1 | мкг/мл | 178 | 229 | 164 |
| $AUC_{last}$ | сутки×мкг/мл | 2801 | 2708 | 1418 |
| $t_{1/2}$ | d | 11,3 | 4,7 | 7,6 |

$C_{max}$=пиковая концентрация; AUC - площадь под кривой концентрации-времени; $AUC_{last}$ - AUC, вычисленная от нулевого момента времени и до времени последней положительной концентрации; $T_{1/2}$ - наблюдаемое оценочное время полужизни.

Профили средней концентрации в зависимости от времени в сутки 1 показывают, что три антитела H4H12166P, объект сравнения 1 и объект сравнения 2 имели сравнимые концентрации в сыворотке 178, 229 и 164 мкг/мл, соответственно. Объект сравнения 1 имел профиль элиминции, схожий с H4H12166P,

вплоть до суток 30, но в сутки 40 и 50 демонстрировал быстрое увеличение клиренса по сравнению с H4H12166P. В сутки 50 H4H12166P имел усредненную концентрацию антитела в сыворотке приблизительно 9 мкг/мл, тогда и как объект сравнения 1 и объект сравнения 2 имели в 30 раз сниженную усредненную концентрацию антитела в сыворотке 0,3 мкг/мл. объект сравнения 2 демонстрировал наименьшую экспозицию из трех тестированных антител, с приблизительно 2-кратно более низкой $AUC_{last}$ (1408 сутки × мкг/мл) по сравнению с H4H12166P (2801 сутки × мкг/мл) и объектом сравнения 1 (2708 сутки × мкг/мл).

Фармакологические эффекты антител против C5 H4H12166P, объекта сравнения 1 и объекта сравнения 2 из образцов сыворотки гуманизированных C5 мышей с добавлением C3 человека измеряли до суток 50 и определяли ex vivo по гемолизу сенсибилизированных SRBC по классическому пути комплемента (CP). Средний процент гемолиза для каждого антитела против C5 приведен в табл. 28 и профиль среднего процента гемолиза в зависимости от времени представлен на фиг. 5.

Таблица 28

Процент активности гемолиза по классическому пути для антител против C5 человека ex vivo

| Время (сутки) | № | % гемолиза по классическому пути в 10% сыворотке мыши, 60 мин, среднее ± SEM | | |
|---|---|---|---|---|
| | | H4H12166P | объект сравнения 1 | объект сравнения 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 |

Время - время в часах после инъекции одной дозы; сутки - сутки исследования; SEM - стандартная ошибка среднего; ND - не обнаруживали; NS - нет образцов.

*Для объекта сравнения 2 в сутки 50 n=3 из-за невозможности анализа одного образца в силу технических проблем H4H12166P, объект сравнения 1 и объект сравнения 2 ингибировали терминльную гемолитическую активность комплемента, по-видимому, коррелирующую с экспозициями антител. H4H12166P блокировало больше чем 85% гемолитической активности до суток 30 с возвращением активности к базовым уровням перед дозой с суткам 50. объект сравнения 1 и объект сравнения 2 блокировали приблизительно 80% гемолитической активности до суток 20 и суток 10, соответственно, с возвращением активности к базовым уровням с суткам 30 для обоих.

Эксперимент 2.

В этом эксперименте фармакокинетику и фармакодинамику антител против C5 H4H12166P, H4H12161P, объекта сравнения 1 и изотипического контроля оценивали у гуманизированных C5 мышей (мышей, гомозиготных по экспрессии C5 человека). Общие уровни циркулирующего C5 определяли с использованием Human Complement C5 ELISA (Abcam, № по каталогу ab125963), который осуществляли в соответствии с рекомендациями производителя. Определяли, что усредненные концентрации C5 человека у мышей составляют 48,98 мкг/мл ±15,1 мкг/мл.

Перед дозированием антител, самцов и самок гуманизированных C5 мышей стратифицировали в соответствии с уровнями C5 человека, которые усредненно составляли 50 мкг/мл. Для каждого mAb против C5, когорты из 5 мышей получали одну подкожную (s.c.) инъекцию 15 мг/кг H4H12166P, H4H12161P, объекта сравнения 1 или изотипического контроля. У всех мышей брали кровь перед дозой, через 6 ч, 1, 2, 3, 4, 7, 10, 13, 21, 30 и 45 суток после инъекции для PK анализа. Кроме того, в сутки 59, всех мышей из каждой когорты умерщвляли и брали терминльные образцы крови для PK и PD анализа. Из крови получали сыворотку, которую замораживали при -80°C до анализа.

Общие концентрации антител определяли в 12 моментов времени и процент активности гемолиза определяли в 1 момент времени в течение 59-суточного прижизненного периода. Общие сывороточные концентрации антител для каждого антитела против C5 сведены в табл. 29. Профили средних общих концентраций антител в зависимости от времени приведены на фиг. 6. Средние PK параметры описаны в табл. 30.

Таблица 29

Средние концентрации общего IgG в сыворотке после одной подкожной инъекции выбранных антител против C5 15 мг/кг гуманизированным C5 мышам

| Время (сутки) | Концентрация Ab в сыворотке (мкг/мл) среднее ± SD | | | |
|---|---|---|---|---|
| | H4H12166P | H4H12161P | Объект сравнения 1 | Изотипический контроль |
| 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 |

Время - время в часах после инъекции одной дозы; сутки - сутки исследования; SD - стандартное отклонение; SEM - стандартная ошибка среднего,; ND - не обнаруживали; NS - нет образцов.

Таблица 30

PK параметры

| Параметр | Единицы | Тестовое антитело (среднее ± SD) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | H4H12166P | H4H12161P | Объект сравнения 1 | Изотипический контроль |
| $C_{max}$ | мкг/мл | 178 ± 10 | 225 ± 22 | 183 ± 18 | 221 ± 19 |
| $AUC_{last}$ | сутки×мкг/мл | 3490 ± 590 | 3040 ± 900 | 2240 ± 780 | 4080 ± 480 |
| $t_{1/2}$ | D | 11 ± 1 | 5,8 ± 2 | 4,2 ± 1 | 9,9 ± 4 |

$C_{max}$= пиковая концентрация; AUC - площадь под кривой концентрации-времени; $AUC_{last}$ - AUC, вычисленная от нулевого момента времени и до времени последней положительной концентрации; $T_{1/2}$ - наблюдаемое оценочное время полужизни.

Профили средних концентраций в зависимости от времени показывают, что H4H12166P, H4H12161P, объект сравнения 1 и изотипический контроль достигали максимальной концентрации в сыворотке ($C_{max}$) между сутками 1 и 3, при сравнимых значениях $C_{max}$ в пределах 1,3 крат (178, 225, 183 и 221) мкг/мл, соответственно. H4H12166P и изотипический контроль имели схожие профили элиминции, при уровнях остающихся лекарственных средств приблизительно 4 мкг/мл в сутки 59. H4H12161P демонстрировало более быстрый клиренс, чем H4H12166P и изотипический контроль, но выводилось более медленно, чем объект сравнения 1. В сутки 59 H4H12161P имело средний сывороточный уровень лекарственного средства 0,6 мкг/мл, тогда как объект сравнения 1 имел почти неподдающийся обнаружению уровень лекарственного средства 0,08 мкг/мл.

Изотипический контроль, H4H12166P и H4H12161P демонстрировали сравнимые значения экспозиции ($AUC_{last}$) в пределах 1,3 крат (4080, 3490 и 3040 сутки×мкг/мл, соответственно), тогда как объект сравнения 1 проявлял в 1,6 раза более низкую экспозицию (2240 сутки×мкг/мл) по сравнению с H4H12166P.

Пример 12: анализ на основе LC-MRM-MS для определения концентрации общего C5 человека.

В этом примере концентрации общего C5 человека в сыворотке определяли с использованием жидкостной хроматографии в сочетании со способом масс-спектрометрического мониторинга множества реакций (LC-MRM-MS) в исследовании фармакокинетики/фармакодинамики антитела против C5 H4H12166P.

Концентрации общего C5 человека в сыворотке определяли посредством измерения концентрации 10-аминокислотного пептида LQGTLPVEAR (a.o. 1129-1138 в SEQ ID NO: 359), содержащегося в последовательности C5, в качестве посредника для C5. Теоретически этот способ также позволяет обнаруживать C5b - продукт расщепления C5. Однако из-за нестабильности свободного C5b, концентрации C5b в сыворотке в целом низки, а большинство C5b связано с клеточными поверхностями в форме комплексов MAC (Cooper & Muller-Eberhard 1970, J. Exp. Med. 132: 775-93; Hadders et al 2012, Cell Rep. 1: 200-7).

Следовательно, обработанные образцы сыворотки, которые анализировали здесь, вероятно содержат только несущественные количества продукта C5b, если вообще содержат.

Способы.

Для PK/PD исследования мыши получали одну дозу H4H12166P 15 мг/кг посредством подкожной (s.c.) инъекции. У всех мышей брали кровь перед дозой и в сутки 1 после инъекции для PK анализа. Кроме того, через 10, 20, 30, 40, 50 и 60 суток после инъекции мышей умерщвляли и брали терминльные образцы крови для PK и PD анализа.

C5 человека использовали в качестве эталонного стандарта для калибровки; и пептид C5 человека, полученный с использованием C-концевого остатка аргинина, меченного стабильным изотопом, использовали в качестве внутреннего стандарта (LQGTLPVEAR-13C615N4). Эталонный стандарт использовали в концентрациях в диапазоне от 3,9 до 250 мкг/мл (серийные разведения 1:2) в сыворотке от самостоятельно созданных мышей с нокаутом C5, у которых удаляли ген C5 мыши (C5-/-). Сыворотку от C5-/- мышей также использовали в качестве отрицательного контроля (пустая проба). Калибровочные стандарты, пустые пробы и исследуемые образцы сыворотки (10 мкл кажд.) сушили и затем денатурировали в 100 мкл буфера из 8M мочевины/20 мМ Tris(2-карбоксиэтил)фосфина (TCEP) при 37°C в течение 1 ч. Затем 10 мкл 25 нМ внутреннего стандарта добавляли во все образцы. Образцы алкилировали с использованием 10 мМ 2-йодацетамида при комнатной температуре в течение 30 мин и разводили с использованием 50 мМ бикарбоната аммония до конечного объема 500 мкл. Затем образцы расщепляли трипсином (1:20 мас./мас.) в течение ночи при 37°C. Триптический пептид LQGTLPVEAR, происходящий из C5, обнаруживали и определяли количественно с помощью LC-MRM-MS, используя Waters Xevo TQ-S с системой ACQUITY UPLC. Каждый обработанный образец (10 мкл) инъецировали в предварительно уравновешенную колонку ACQUITY UPLC BEH C18. Скорость потока составляла 0,6 мл/мин (подвижная фаза A: вода:муравьиная кислота/100:0,1 [об./об.] и подвижная фаза B: ацетонитрил:муравьиная кислота/100:0,1 [об./об.]). Время удержания и площадь пика определяли с использованием программного обеспечения Masslynx Analyst Data (Waters). Концентрации анализируемого вещества C5 вычисляли по калибровочной кривой, которую создавали посредством построения графика соотношения площадей пиков для эталонного стандарта C5 (не меченный пептид C5 LQGTLPVEAR-$^{12}C_6{}^{14}N_4$, созданный триптическим расщеплением hC5) и внутреннего стандарта (пептид C5, меченный стабильным изотопом) в зависимости от номинальной концентрации эталонного стандарта C5. Концентрации вычисляли с использованием линейной регрессии. Наименьшая концентрация эталонного стандарта C5 (3,9 мкг/мл) находилась в динамическом диапазоне анализа, и ее определяли в качестве LLOQ анализа.

Результаты.

Концентрации общего C5 человека в сыворотке оценивали для взятых образцов и через взятие крови из хвоста перед дозированием (перед дозой) и через терминльное взятие крови в сутки 10, 30 и 35 у соответствующих животных. Общие концентрации hC5 после дозирования H4H12166P были схожими (в пределах от ~1 до 0,9 крат) с уровнями перед дозой в сутки 10, 30 и 35 после дозирования. Наблюдаемые небольшие различия не были статистически значимыми, как оценивали с помощью критерия Манна-Уитни, используя программное обеспечение GraphPad Prism. Анализ молярного соотношения C5/H4H12166P демонстрировал, что H4H12166P оставался в молярном избытке относительно C5 до суток 35 после дозирования (табл. 31).

Таблица 31

Сводка PD характеристик для H4H12166P

| Сутки после дозы | % CP гемолиза среднее ± SD | % ингибирования | C5 (мкг/мл) | | | H4H12166P (мкг/мл) среднее ± SD | Молярное соотношение терминальных C5: H4H12166P |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Перед дозой | Терминальный | Кратность изменения | | |
| 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 | Все животные в группе исключены из-за титров MAHA > 1000 | | | | | | |
| 60 | 73,57 | 5 | n/d | | | 5,9 | n/d |

[a] Процентную долю ингибирования CP гемолитической активности вычисляли по средним значениям % CP гемолиза в указанные сутки после дозирования относительно среднего значения % CP гемолиза в сутки 0. [b] Кратность изменения - терминльный (указанные сутки после дозирования) C5:C5 перед дозой. SD - стандартное отклонение; MAHA - антитело мыши против человека; n/d - не определяли.

Животных с данными, на которые влияли MAHA, полностью исключали из вычислений (2× сутки

30, 1× сутки 35, 2× сутки 40 и все 4 мыши в сутки 50).

Пример 13: картирование эпитопов для связывания H4H12166P с C5 по водород-дейтериевому обмену.

Картирование эпитопов по H/D обмену с масс-спектрометрией осуществляли для того, чтобы определять аминокислотные остатки hC5 [(аминокислоты M1-C1676 из SEQ ID NO: 359), с которыми взаимодействует H4H12166P. Общее описание способа H/D обмена приведено, например, в Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267(2):252-259; and Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73:256A-265A.

HDX-MS эксперименты осуществляли на интегрированной платформе Waters HDX/MS, состоящей из системы Leaptec HDX PAL для мечения дейтерием, Waters Acquity M-Class (Auxiliary solvent manager) для расщепления образцов и загрузки, Waters Acquity M-Class (μBinary solvent manager) для градиента аналитической колонки и масс-спектрометр Synapt G2-Si для измерения масс пептических пептидов.

Раствор для мечения получали в 10 мМ буфере PBS в $D_2O$ при pD 7,0 (эквивалент pH 6,6). Для мечения дейтерием 3,8 мкл C5 (6 пмоль/мкл) или C5, предварительно смешанный с антителом в молярном соотношении 1:1, инкубировали с 56,2 мкл $D_2O$ раствора для мечения для различных моментов времени (например, не дейтерированный контроль=0 с, метили в течение 1 мин и 20 мин). Дейтерирование гасили посредством переноса 50 мкл образца в 50 мкл предварительно охлажденного гасящего буфера (0,2М TCEP, 6М хлорид гуанидина в 100 мМ фосфатном буфере, pH 2,5) и смешанный образец инкубировали при 1,0°C в течение двух мин. Затем погашенный образец впрыскивали в Waters HDX Manager для втсроенного расщепления пепсином/протеазой XIII. Расщепленные пептиды улавливали на предколонке ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard 1,7-мкм, 2,1×5 мм при 0°C и элюировали в аналитическую колонку ACQUITY UPLC BEH C18 1,7-мкм, 1,0×50 мм в течение 9-минного градиентного разделения 5%-40% B (подвижная фаза A: 0,1% муравьиная кислота в воде, подвижная фаза B: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле). Масс-спектрометр настраивали на напряжение на конусе 37 В, время сканирования 0,5 с и диапазон масса/заряд 50-1700 единиц Томсона (Th).

Для идентификации пептидов из C5 человека, данные LC-MSE от недейтерированного образца обрабатывали и проводили поиск в базе данных, содержащей C5 человека, пепсин и их рандомизированные последовательности через программное обеспечение Waters ProteinLynx Global Server (PLGS). Идентифицированные пептиды импортировали в программное обеспечение DynamX и осуществляли фильтрацию по двум критериям: (1) минимум продуктов на аминокислоту =0,3 и (2) порог файлов репликации =3. Затем программное обеспечение DynamX автоматически определяло захват дейтерия для каждого пептида на основе времени удержания и высокой точности массы (<10 ч./млн) для множества моментов времени с 3 повторениями для каждого времени.

Используя встроенную колонку с пепсином/протеазой XIII, сопряженную с регистрацией данных MSE, всего 189 пептидов из C5 человека идентифицировали в отсутствии или присутствии антитела, что представляет покрытие последовательности 62%. В табл. 32 проиллюстрированы 5 пептидов, которые имели значительно сниженный захват при дейтерировании (центроидные дельта-значения >0,9 Да с p-значениями <0,05), когда связаны с H4H12166P.

Таблица 32

Дейтерирование пептидов C5 человека при связывании с H4H12166P

| Остатки | Дейтерирование 1 мин | | | Дейтерирование 20 мин | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | C5 центроид H+ | C5+H4H12166P центроид MH+ | Δ | C5 центроид MH+ | C5+H4H12166P центроид 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 |

Зарегистрированная масса пептида соответствует усредненному значению центроидной MH+ массы из трех повторений. Эти пептиды, соответствующие аминокислотам 591-599 и 775-794, имели более низкую скорость дейтерирования при связывании с H4H12166P. Эти идентифицированные остатки также соответствуют остаткам 591-599 и 775-794 в C5 человека, как определено с помощью записи Uniprot P01031 (CO5_HUMAN; SEQ ID NO: 359).

Пример 14: эффект антител против C5, оказываемый на воспаление глаза в экспериментальном аутоиммунном увеите у мышей.

Данное исследование проводили для того, чтобы оценивать роль C5 в экспериментальном аутоиммунном увеите (EAU). Использовали как генетический [нокаут C5 (KO), мыши с двойным C3/C5 KO], так и фармакологический (антитело против C5) экспериментальные подходы.

Способы.

Использовали взрослых мышей C57BL/6J (n=25, Jackson labs), мышей с C5 KO (n=13) и C3/C5 KO (n=8) (Regeneron Pharmaceuticals Inc.). EAU индуцировали посредством подкожной инъекции пептида межфоторецепторного ретиноид-связывающего белка человека (IRBP, New England Peptide) в полном адъюванте Фрейнда и интраперитонеальной инъекции токсина коклюша. mAb против C5 мыши или mAb изотипического контроля вводили через подкожные инъекции каждые 3 суток от суток 5 до суток 28. Антитело против C5 мыши, использованное в этом исследовании (M1M17628N), содержало HCVR/LCVR из SEQ ID NO: 362/363. SPECTRALIS® HRA+OCT (Heidelberg Engineering, Inc.) использовали для того, чтобы оценивать уровни воспаления в сутки -1, 7, 14, 21 и 28. Всех животных умерщвляли в сутки 28 для взятия глаз и крови. Анализ гемолиза с/без C3 человека осуществляли для валидации ингибирования комплемента. Данные анализировали посредством ANOVA.

Результаты.

По сравнению с мышами дикого типа, возникновение воспаления (30-50%) и число клеточных кластеров стекловидного тела были значительно снижены у C5 KO мышей ($p<0,01$). Оценки оптической когерентной томографии (OCT) у C5 KO мышей также значительно снижены 50% на неделе 3 ($p<0,0001$). Интересно, что у мышей с двойным C3/C5 KO значительно больше клеточных кластеров стекловидного тела и выше оценки заболевания к суткам 28 по сравнению с мышами дикого типа ($p<0,05$). У животных, которые получали Ab против mC5 (50 мг/кг), заболеваемость воспалением и клеточные кластеры стекловидного тела значительно снижены по сравнению с отсутствием лечения или изотипической контрольной группой к суткам 21 ($p<0,01$). В недели 3 и 4 оценки OCT в группе лечения антителом против C5 значительно ниже по сравнению с отсутствием лечения или изотипическим контролем ($p<0,0001$). (фиг. 7) Анализ гемолиза с/без C3 человека подтверждал эффект ингибирования антителом против C5 в неделю 4 (фиг. 8).

Заключение.

Воспаление глаз из-за EAU смягчали посредством ингибирования активности C5, через генетическую делецию или фармакологическое ингибирование с использованием специфического антитела против C5. Истощение C5 задерживало возникновение EAU и снижало OCT оценку заболевания. Эти результаты показывают, что C5 является потенциальной терапевтической мишень при аутоиммунном увеите. Антитело против C5 оказывает защитный эффект при заболевании EAU у мышей дикого типа. Находки авторов изобретения также подсказывают, что C3 может быть полезен для заболевания EAU у мышей.

Пример 15: эффект антител против C5 человека, оказываемый на экспериментальный аутоиммунный увеит.

В этом примере описаны эффекты антител к C5 против C5 человека в модели экспериментального аутоиммунного увеита (EAU) на мышах. Мышей, которых использовали в этом исследовании, гуманизировали для того, чтобы экспрессировать белок C5 человека, используя технологию Velocigene® (Valenzuela et al 2003, Nat. Biotechnol. 21: 652-659). Создавали гуманизированных мышей с заменой экзонов 2-41 гена C5 мыши на экзоны 2-42 гена C5 человека (раскрыто в публикации патентной заявки США 2015/0313194, включенной в настоящее описание в полном объеме).

Способы.

Взрослых самцов мышей иммунизировали подкожно в каждое бедро с использованием 150 мкг пептида 1-20 (GPTHLFQPSLVLDMAKVLLD) (SEQ ID NO: 364) межфоторецепторного ретиноид-связывающего белка (IRBP) человека (Avichezer et al 2000, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41:127-131) в 0,2 мл эмульсии CFA, с добавлением штамма Mycobacterium tuberculosis H37RA до 2,5 мг/мл. Затем мышам интраперитонеально инокулировали 1,0 мкг токсина коклюша (PTX) для того, чтобы содействовать индукции клеточноопосредованного аутоиммунитета, содействуя Th1-поляризации иммунного ответа (Thurau et al 1997, Clin. Exp. Immunol. 109: 370-376; Silver et al 1999, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40: 2898-2905). Мониторинг массы тела животных осуществляли два раза в неделю.

Офтальмологические осмотры осуществляли в сутки - 1, перед индукцией EAU и в сутки 7, 14, 21 и 28. Мышей анестезировали кетамином (120 мг/кг, IP) и ксилазином (5 мг/кг, IP). Зрачки расширяли с использованием 0,5% офтальмологического раствора тропикамида и исследовали дно глаза с использованием контактной линзы с фундус-камерой в системе платформы ангиографии сетчатки (HRA) Spectralis Heidelberg+OCT (Heidelberg Engineering, Carlsbad, CA, USA).

Серию из 61 латерального оптического разреза получали для каждого глаза с использованием OCT функции в системе Spectralis HRA+OCT (Heidelberg Engineering, Carlsbad, CA, USA)). Область OCT визуализации центровали на оптическом диске, делая возможной равную визуализацию над и под головкой

зрительного нерва. Толщину сетчатки измеряли как расстояние между нижней частью слоя RPE и внутренней пограничной мембраной глаза. Измерения выполняли в 1500 мкм от диска зрительного нерва и значения из 4 различных квадратов сетчатки (например, верхнего, нижнего, височного и носового) усредняли для получения средней толщины сетчатки глаза.

Также на ОСТ изображениях тяжесть инфильтрации стекловидного тела воспалительными клетками ранжировали посредством оценки усредненного числа воспалительных клеточных кластеров в стекловидном теле, в четырех латеральных ОСТ сканированиях, которые пересекали зрительный нерв, на каждый глаз.

Разрабатывали шкалу из 4 степеней для оценки тяжести заболевания на ОСТ изображениях (ОСТ оценки) (табл. 33).

Таблица 33

Оценка EAU in vivo с использованием оптической когерентной томографии (ОСТ)

| Степень | Критерии |
|---|---|
| 0 | Без изменений |
| 0,5 (след) | Небольшая инфильтрация воспалительными клетками в стекловидном теле, в первую очередь около головки зрительного нерва (<15 кластеров) |
| 1 | Небольшая инфильтрация воспалительными клетками в стекловидном теле, в первую очередь около головки зрительного нерва (<25 кластеров); небольшие очаговые субретинальные повреждения (серые пятна) на периферии; небольшие складки сетчатки на периферии; расширение сосудов сетчатки; периваскулит и васкулит |
| 2 | Умеренная инфильтрация воспалительными клетками в стекловидном теле более диффузная, но не на дальней периферии (<50 кластеров); разрушение слоя сетчатки; формирование гранулем небольшого или среднего размера со складками сетчатки в первую очередь на периферии; расширение сосудов; небольшая очаговая хориоидальная неоваскуляризация; периваскулит и васкулит; небольшой отек сетчатки (<10 мкм) |
| 3 | Умеренная или тяжелая диффузная инфильтрация воспалительными клетками в стекловидном теле (>50 кластеров); диффузное разрушения слоя сетчатки и расширенные сосуды во внутреннем ядерном слое; формирование средних или больших гранулем со складками сетчатки на всем протяжении сетчатки; серьезное |
| | расширение сосудов сетчатки; периваскулит и васкулит; умеренная диффузная хориоидальная неоваскуляризация; умеренный или тяжелый отек сетчатки (10-40 мкм); небольшие отслоения сетчатки |
| 4 | Тяжелая диффузная инфильтрация воспалительными клетками в стекловидном теле (>70 кластеров); диффузное разрушение слоев и расширенные сосуды во внутреннем ядерном слое; диффузное формирование тяжелых гранулем со складками сетчатки; тяжелая диффузная хориоидальная неоваскуляризация; периваскулит и васкулит; дегенерация сетчатки или тяжелый отек сетчатки (уменьшение >20 мкм или увеличение >40 мкм, соответственно); обширное отслоение сетчатки |

Статистический анализ.

Статистический анализ параметрических данных (масса тела, воспалительные клеточные кластеры в стекловидном теле и толщина сетчатки) осуществляли посредством однофакторного дисперсионного

анализа и критерия множественного сравнения Тьюки. Для непараметрических данных (оценки ОСТ и гистологические оценки) анализ осуществляли посредством критерий Краскела-Уоллиса и критерия Данна с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 5.0d в отношении изотипического контроля или групп без лечения. Данные представляют средние значения±SEM. p-значения меньше 0,05 считали статистически значимыми.

Результаты.

В первом исследовании (исследование A), мышей лечили подкожно каждые 3 суток от суток 5 изотипическим контрольным антителом (50 мг/кг) или 10 мг/кг или 50 мг/кг H4H12170P. Лечение с использованием 10 мг/кг H4H12170P вело к снижению воспаления и повреждения сетчатки (фиг. 9). Мыши, которых лечили с использованием 10 мг/кг H4H12170P, также демонстрировали статистически значимое снижение оценок ОСТ к суткам 21 и суткам 28 (фиг. 10).

Во втором исследовании (исследование B), мышей лечили подкожно каждые 3 суток от суток 6 с использованием изотипического контроля (10 мг/кг), 3 мг/кг или 10 мг/кг H4H12166P или с использованием объекта сравнения 2 (см. пример 2 в настоящем описании; "контрольные конструкции, используемые в следующих примерах"). Лечение с использованием H4H12166P или по 3 мг/кг или по 10 мг/кг вызывало дозозависимое снижение оценок ОСТ, которое было статистически значимым в сутки 14-28 (фиг. 11). Лечение с использованием 10 мг/кг H4H12166P у C5 гуманизированных мышей начиная с 6 суток после индукции EAU вело к дозозависимому снижению воспаления и повреждения сетчатки, как определяют посредством ОСТ, проведенной в сутки 14-28 (фиг. 12).

Для обоих исследований неинвазивная прижизненная оценка с помощью ОСТ демонстрировала прогрессирующее развитие воспаления, увеличение толщины сетчатки и морфологические аномалии у контрольных животных после иммунизации с использованием IRBP.

Заключение.

Эти эксперименты предоставляют дополнительное фармакологическое свидетельство того, что C5 играет роль в патогенезе аутоиммунного увеита. Фармакологическое истощение C5 человека с помощью антитела полностью человека против C5 человека отсрочивало заболеваемость EAU и снижало тяжесть заболевания, подтверждая эффект этих антител при аутоиммунном увеите.

Пример 16: эффект антител против C5, оказываемый на реперфузионное повреждение при почечной ишемии.

Данное исследование осуществляли для того, чтобы оценивать роль C5 при реперфузионном повреждении при почечной ишемии. Использовали как генетический (с использованием мышей с нокаутом C3 и нокаутом C5), так и фармакологический подходы (с использованием антител против C5). Модель реперфузии при ишемии создавали посредством билатерального пережатия ножек сосудов почек на 45 мин, после чего следовало 48 ч реперфузии. Имитация лапаротомии служила в качестве контроля. Антитело против C5 вводили по 50 мг/кг внутривенно в однократной дозе непосредственно после ишемии (лечебная); или подкожно в виде двух доз, в сутки -1 и сутки 1 хирургического вмешательства (профилактически). В этом исследовании использовали антитело против C5 M1M17628N, содержащее HCVR/LCVR из SEQ ID NO: 362/363. Маркеры азот мочевины в крови (BUN) и креатинин сыворотки использовали для того, чтобы оценивать у мышей уровни заболевания и зашиты.

Таблица 34

Процент изменения уровней азота мочевины в крови мышей, которых лечили антителом против C5 (M1M17628N) в профилактическом и терапевтическом режимах

| BUN,% изменения ср. | RIRI+носитель | RIRI+изотипический контроль |
|---|---|---|
| | Сутки 2 | Сутки 2 |
| RIRI+M1M17628N (проф.) | -37,19 | -34,68 |
| RIRI+M1M17628N (леч.) | - 53,70 | -51,85 |

Таблица 35

Процент изменения уровней креатинина сыворотки у мышей, которых лечили антителом против C5 (M1M17628N) в профилактическом и терапевтическом режимах

| SCr,% изменение ср. | RIRI+носитель | RIRI+изотипический контроль |
|---|---|---|
| | Сутки 2 | Сутки 2 |
| RIRI+M1M17628N (проф.) | -53,09 | -49,34 |
| RIRI+M1M17628N (леч.) | -59,40 | -56,16 |

По сравнению с мышами дикого типа, мыши с нокаутом C3 и C5 демонстрировали значительную функциональную защиту в RIRI модели острого повреждения почек, о чем свидетельствовало снижение уровней азота мочевины в крови и креатинина сыворотки. Антитело против C5 демонстрировало функцио-

нальную защиту в RIRI модели как в профилактическом, так и в терапевтическом режимах (табл. 34-35).

Пример 17: эффект антител против C5, оказываемый на волчаночный нефрит.

В этом примере описан эффект антител против C5 при лечении волчаночного нефрита в модели на мышах.

Системная красная волчанка (SLE) представляет собой аутоиммунное нарушение, обусловленное утратой толерантность к собственным антигенам, образованием аутоантител и отложением иммунных комплексов (IC), фиксирующих комплемент, в пораженных тканях. SLE отличается широким диапазоном клинических манифестаций и целевых органов, причем волчаночный нефрит является одним из наиболее серьезных осложнений. Активация комплемента в почках пациентов с волчаночным нефритом вносит вклад в воспаление и повреждение ткани. Эффект антител против C5 при лечении волчаночного нефрита изучали у мышей NZBWF1, спонтанной мышиной модели волчаночного нефрита (Yang et al 1996, PNAS). У мышей возникает аутоиммунное заболевание наподобие SLE человека, аутоантитела к ядерным антигенам и белкам клеточной мембраны, гипергаммаглобулинемия, альбуминрия, протеинурия, начинается гломерулонефрит иммунных комплексов и гибель от почечной недостаточности и терминльная стадия почечной недостаточности в возрасте от 35 до 50 недель.

Для этого исследования мышей NZBWF1 в возрасте 25 недель подкожно лечили с использованием 30 мг/кг изотипического контроля или антител против C5 два раза в неделю в течение 8 недель, затем три раза в неделю в течение 10 недель. Для этого исследования использовали антитела против C5 мыши M1M17628N и M1M17627N, которые содержат HCVR/LCVR из SEQ ID NO: 362/363 и 365/366, соответственно.

Лечение антителами против C5 значительно усовершенствовало коэффициент выживаемости у мышей (фиг. 13). Оба антитела усовершенствовали альбуминрию на 8-14 неделях лечения (фиг. 14) и уровни азота мочевины в крови на 12-16 неделях лечения (фиг. 15).

Пример 18: эффект антител против C5, оказываемый на гибель клеток астроцитов.

Оптикомиелит (NMO) представляет собой аутоиммунное заболевание центральной нервной системы (CNS), которое преимущественно поражает зрительный нерв и спинной мозг. При NMO аутоантитела против аквапорина-4 (AQP4-Ab) вызывают повреждение астроцитов посредством активации комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). Цели этого исследования состояли в том, чтобы оценивать роль системы комплемента в прогрессировании NMO и использование антитела против белка комплемента в качестве потенциального терапевтического лечения для NMO.

Первичные корковые астроциты крысы получали из коры больших полушарий головного мозга постнатальных детенышей крыс и культивировали с AQP4-Ab (антитело "rAb-53" из публикации патентной заявки США 2014/0170140; Bennett et al 2009, Ann. Neurol. 66: 617-629) и белками комплемента для того, чтобы демонстрировать клеточно-опосредованную цитотоксичность. Затем эксперименты повторяли с добавлением антитела против C5 для того, чтобы демонстрировать блокирование разрушения клеток астроцитов.

Для того чтобы количественно определять гибель клеток, осуществляли люминесцентный цитотоксический анализ CytoTox-Glo™. В анализе использовали различные концентрации антитела против C5 (0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 или 1000 мкг/мл) или изотипическое контрольное антитело.

Для того чтобы определять, может ли антитело против C5 блокировать CDC, индуцированную AQP4-Ab, высевали астроциты и повторяли цитотоксический анализ CytoTox-Glo™, чтобы находить оптимальную дозу AQP4-Ab для этого посева. Обнаруживали, что оптимальная концентрация AQP4-Ab составляет 50 мкг/мл и в следующем эксперименте использовали постоянную дозу AQP4-Ab (50 мкг/мл), тогда как дозу антитела против C5 варьировали. Как показано на фиг. 16, наблюдали снижение в RLU (от усредненно 300 тыс. до усредненно 100 тыс.) с увеличением количества антитела против C5, что демонстрирует, что антитело против C5 блокировало гибель клеток астроцитов. Для обоих экспериментов RLU не изменялись в зависимости от изотипического контрольного антитела. Как показано на фиг. 16, антитела против C5 ингибировали индуцированную AQP4-Ab цитотоксичность на первичных корковых астроцитах с $IC_{50}$ 15-17 нМ.

В будущем исследовании антитело против AQP4 и антитело против C5 следует инъецировать в головной мозг крысы для того, чтобы оценивать терапевтический эффект, оказываемый на комплемент-опосредованную цитотоксичность в отношении астроцитов в CNS.

Пример 19: анализ эндотелия.

В этом примере описан анализ эндотелия клубочков in vitro для исследования блокирования отложения C5b-9 и C3 антителом против C5.

Воспроизводимые способы оценки ингибирующих эффектов кандидатов в лекарственных средства, оказываемых на активацию комплемента, важны для доклинических испытаний. Из-за сложности путей активации комплемента, в анализе следует использовать релевантные клетки и конечные точки для заданного терапевтического показания. Здесь, используя иммортализованную линию клеток эндотелия клубочков человека (HGEC), валидировали модель отложения C3 и C5 комплемента для использования в оценке блокирующей активности mAb против C3 или C5.

Способы.

Первичные клетки эндотелия клубочков почки человека (HGEC; Cell Biologics) высевали на ночь в полную среду в покрытые коллагеном I черные 96-луночные планшеты с чистым дном. Клетки обрабатывали или с использованием PBS (контроль) или активировали в течение 10 мин с использованием 10 мкМ ADP. После промывания в PBS, 50% сыворотку человека (с сохраненным комплементом, истощенную по C3 или истощенную по C5) добавляли на 4 ч. Антитела против C5 добавляли по 1 мг/мл в сыворотку перед лечением. Клетки промывали, фиксировали и исследовали антителами против C3b (Thermofisher) и/или антителами против C5b-9 (Abcam), вторичными антителами и докрашивали с использованием DAPI. Захватывали изображения на ImagExpress и использовали многопараметрический анализ изображения для того, чтобы количественно определять флуоресцентное окрашивание для каждого изображения и усредненно для каждого условия.

Результаты.

Отложение C3 и C5b-9 наблюдали у ADP-активированных HGEC, на которые воздействовали нормальной сывороткой человека, но не у не активированных HGEC (C3: $1,5\times10^{7}\pm1,0\times10^{7}$; C5: $7,9\times10^{6}\pm6,6\times10^{6}$, $P<0,05$ против не ADP-активированных HGEC). Отложение C3 и C5b-9 значительно снижали у ADP-активированных HGEC, на которые воздействовали истощенной по C3 или C5 сывороткой (C3: $3,3\times10^{5}\pm4,8\times10^{4}$; C5: $1,5\times10^{6}\pm6,0\times10^{5}$, $P<0,05$). Добавление блокирующего mAb против C5 значительно снижало отложение C5b-9 из нормальной сыворотки человека на ADP-активированных HGEC, отложение сравнимо с истощенными по C5 сыворотками (C5 mAb: $1,02\times10^{6}\pm6,0\times10^{5}$, контрольное mAb $3,7\times10^{6}\pm1,6\times10^{6}$, $P<0,05$ против контрольного mAb).

Заключение.

Эти данные демонстрируют полезность анализа эндотелия клубочков человека in vitro для моделирования отложения C3 и C5 комплемента. В дополнение к скринингу in vitro, этот анализ обладает потенциалом в качестве трансляционной модели для того, чтобы оценивать стратегии против комплемента при заболевании почек, используя образцы сывороток, полученные у пациентов.

Объем настоящего изобретения не подлежит ограничению конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем описании. В действительности, различные модификации изобретения в дополнение к тем, что описаны в настоящем описании, будут видны специалистам в данной области из приведенного выше описания и сопроводительных фиг. Предусмотрено, что такие модификации входят в объем приложенной формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная молекула полинуклеотида, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) и вариабельную область легкой цепи (LCVR) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с белком фактора 5 комплемента (C5), где HCVR содержит три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и LCVR содержит три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), где:

HCDR1 кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 99;

HCDR2 кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 101;

HCDR3 кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 103;

LCDR1 кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 107;

LCDR2 кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 109; и

LCDR3 кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 111.

2. Выделенная молекула полинуклеотида по п.1, где вариабельная область тяжелой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 97.

3. Выделенная молекула полинуклеотида по п.1, где вариабельная область легкой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 105.

4. Выделенная молекула полинуклеотида по п.1, где вариабельная область тяжелой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 97; и вариабельная область легкой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 105.

5. Вектор, содержащий молекулу полинуклеотида по п.1.

6. Вектор, содержащий молекулу полинуклеотида по п.2.

7. Вектор, содержащий молекулу полинуклеотида по п.3.

8. Вектор, содержащий молекулу полинуклеотида по п.4.

9. Клетка, содержащая вектор по п.5.

10. Клетка по п.9, которая представляет собой клетку яичника китайского хомяка.

11. Клетка, содержащая вектор по п.6.

12. Клетка по п.11, которая представляет собой клетку яичника китайского хомяка.

13. Клетка, содержащая вектор по п.7.

14. Клетка по п.13, которая представляет собой клетку яичника китайского хомяка.

15. Клетка, содержащая вектор по п.8.

16. Клетка по п.15, которая представляет собой клетку яичника китайского хомяка.

17. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с белком фактора 5 комплемента (C5), содержащих вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), которая содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 HCVR, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 98, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), которая содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 LCVR, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106, где способ включает: введение полинуклеотида, кодирующего HCVR и LCVR в клетку-хозяина, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 100; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 102; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 104; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 108; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 110; LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 112 культивирование клетки-хозяина в условиях, допускающих получение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и извлечение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полученных таким образом.

18. Способ по п.17, где:

HCDR1 кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 99;

HCDR2 кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 101;

HCDR3 кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 103;

LCDR1 кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 107;

LCDR2 кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 109; и

LCDR3 кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 111.

19. Способ по п.17, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 98.

20. Способ по п.17, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106.

21. Способ по п.17, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 98, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106.

22. Способ по п.21, где вариабельная область тяжелой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 97.

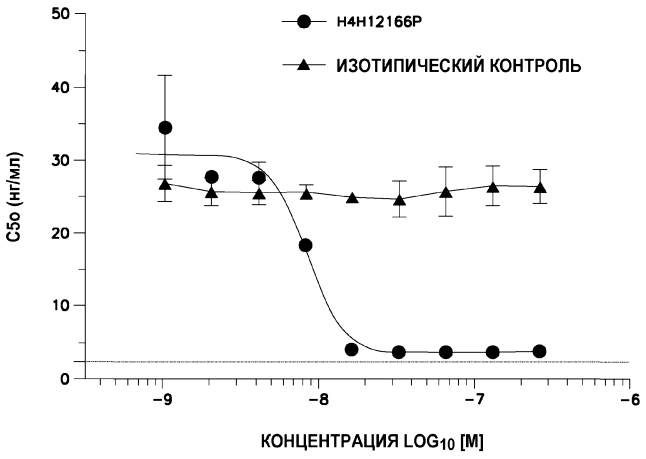
23. Способ по п.21, где вариабельная область легкой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 105.

24. Способ по п.21, вариабельная область тяжелой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 97; и вариабельная область легкой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 105.

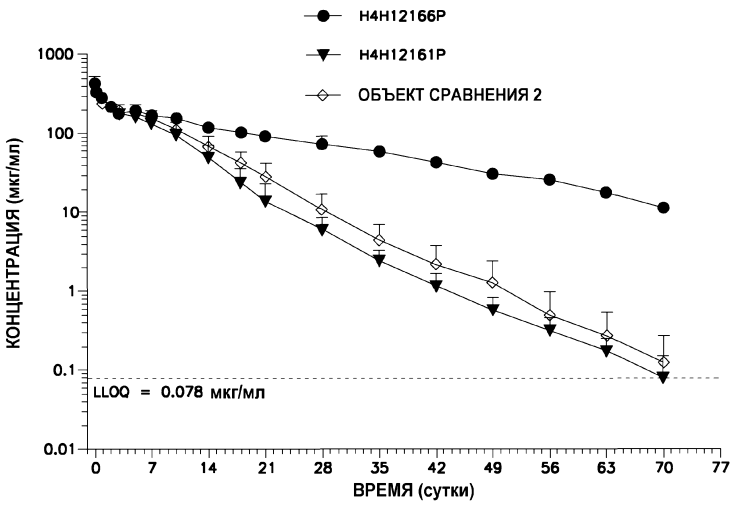
25. Способ по п.17, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 353.

26. Способ по п.17, где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 354.

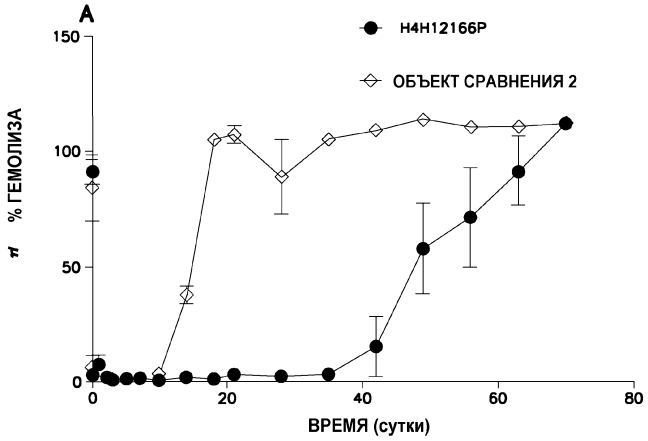
27. Способ по п.17, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 353; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 354.



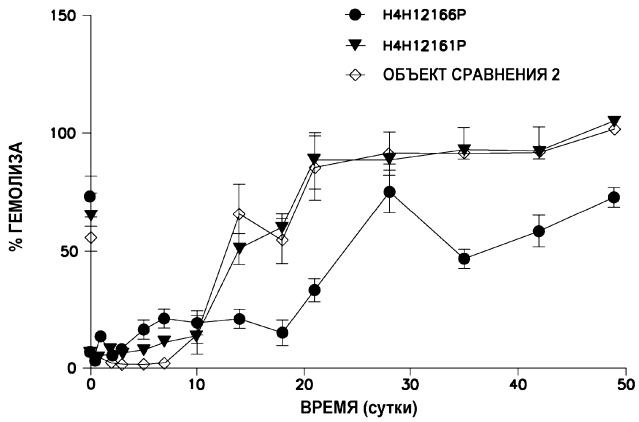

Фиг. 1



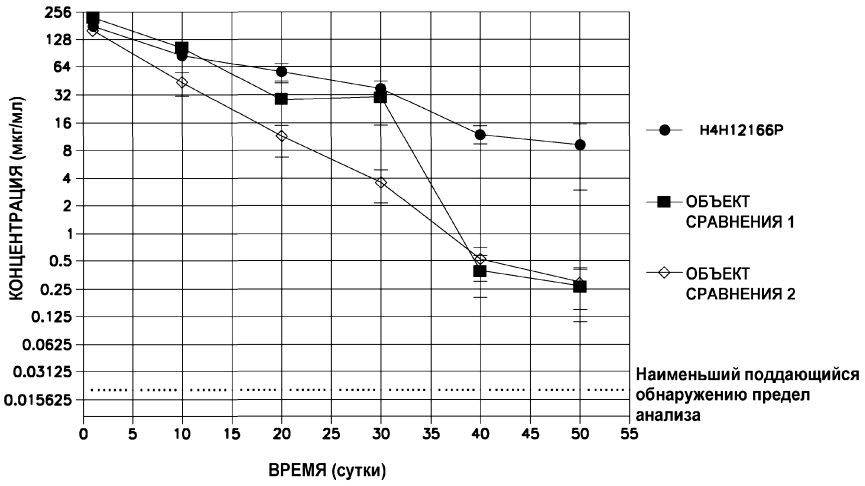

Фиг. 2



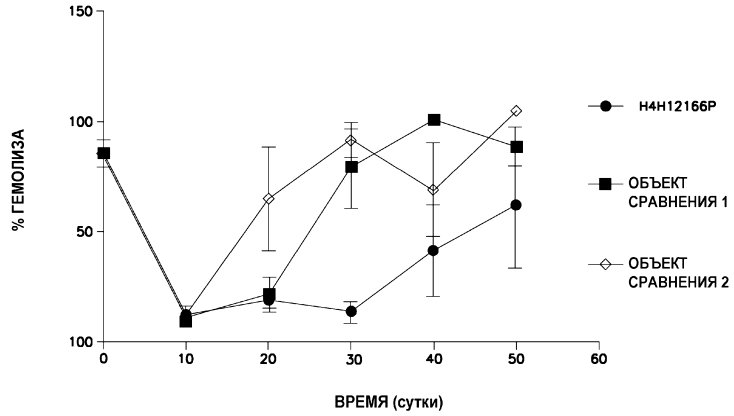

Фиг. 3A



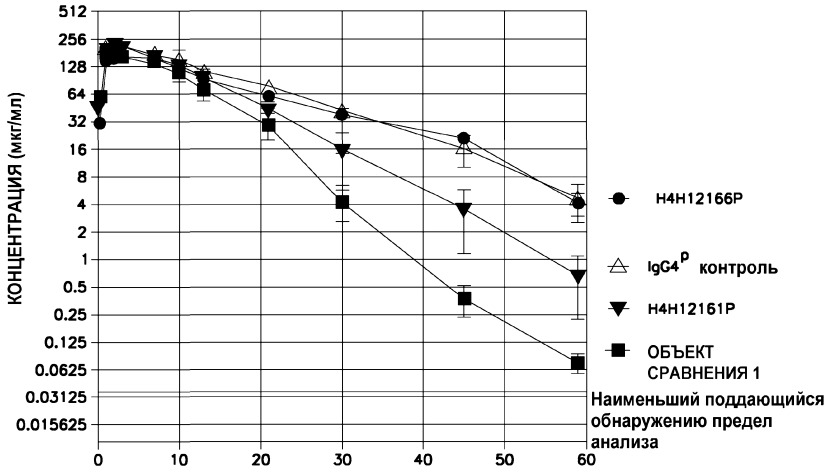

Фиг. 3B



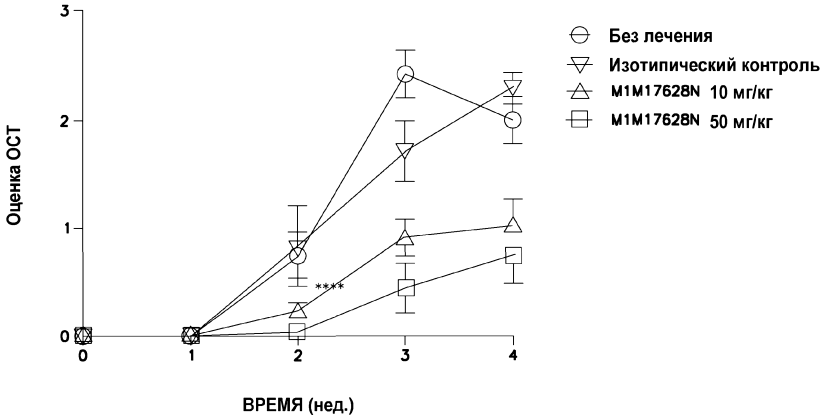

Фиг. 4



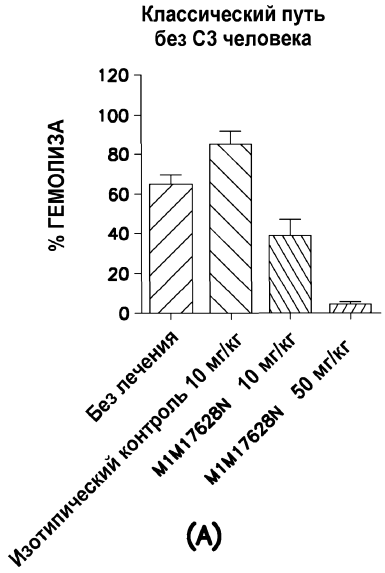

Фиг. 5



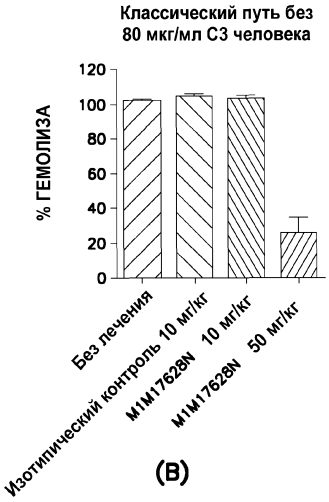

Фиг. 6



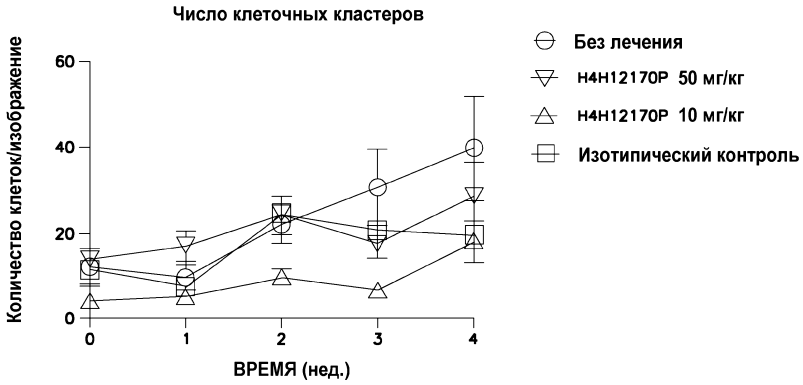

Фиг. 7



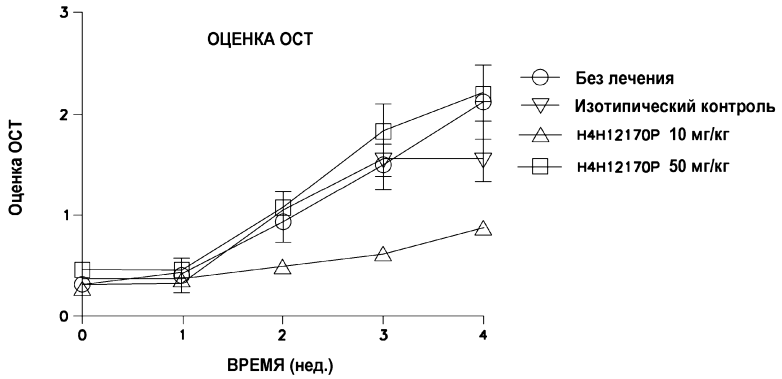

Фиг. 8A



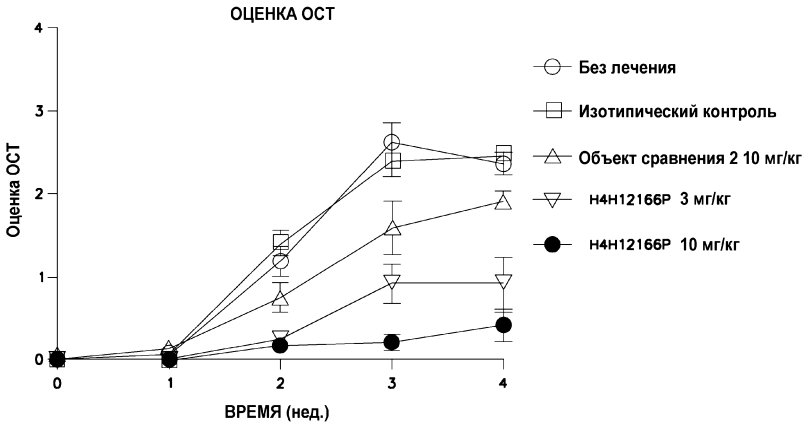

Фиг. 8B



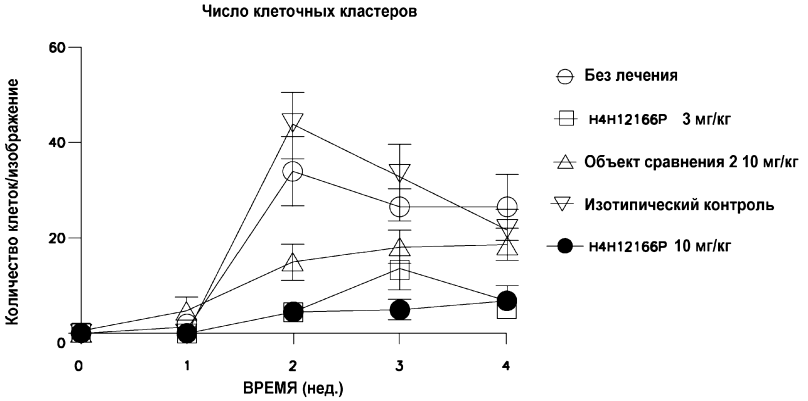

Фиг. 9



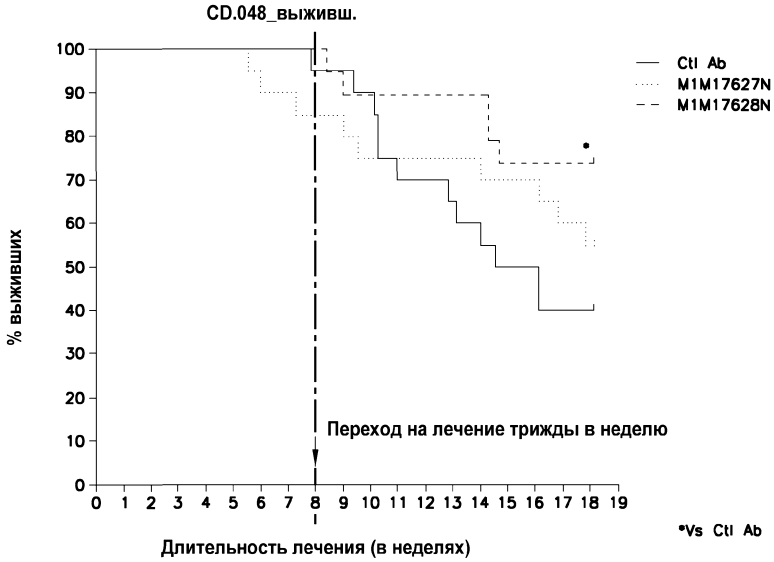

Фиг. 10



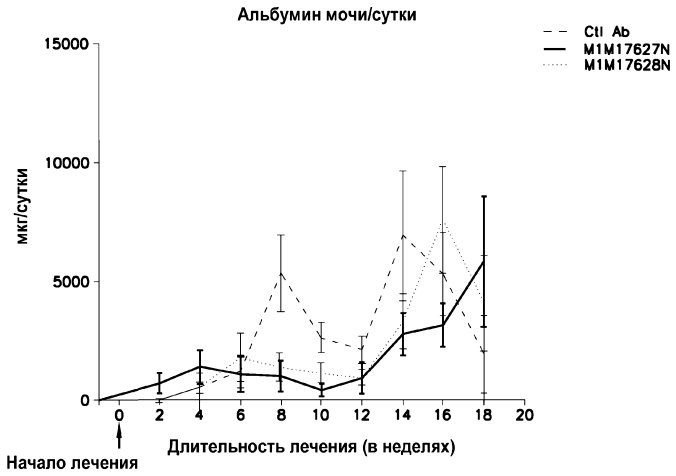

Фиг. 11



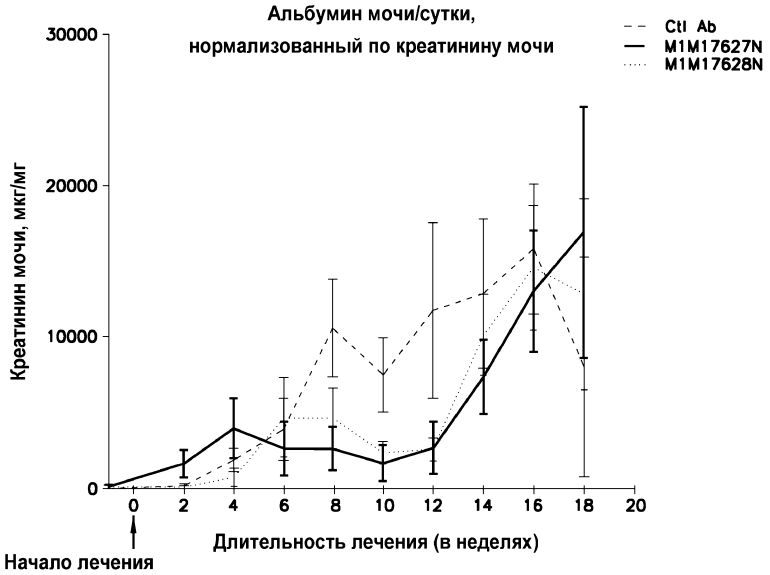

Фиг. 12



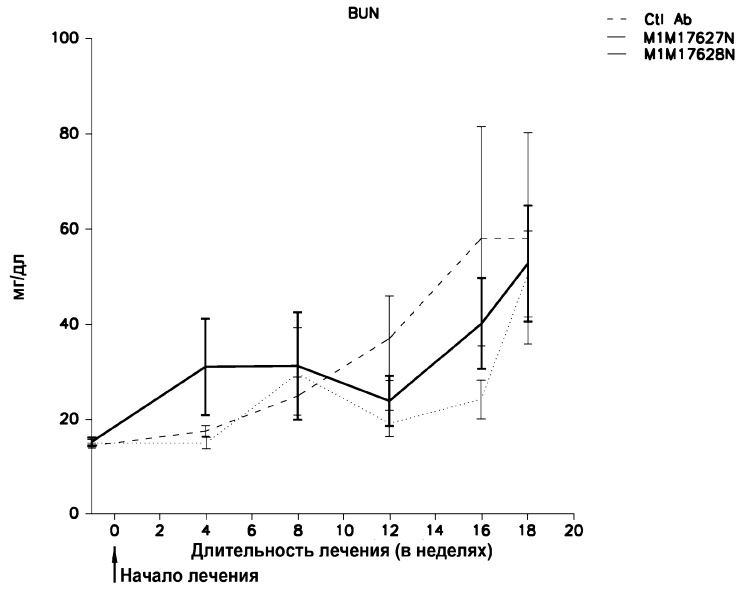

Фиг. 13



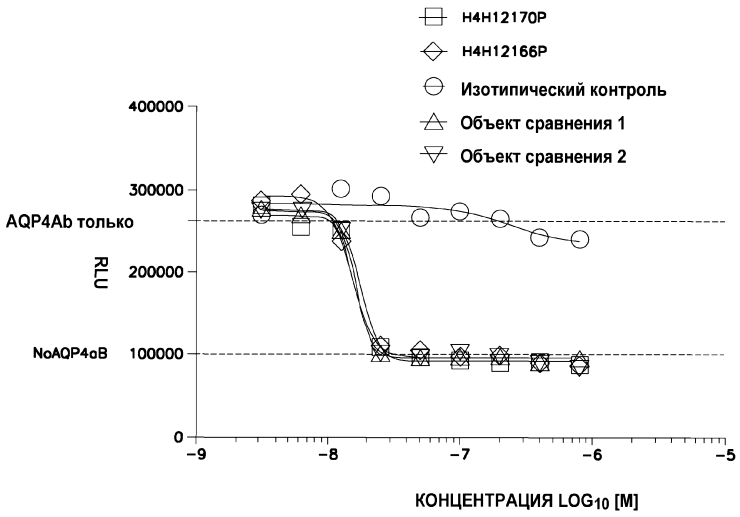

Фиг. 14A




Фиг. 14B


BUN
Ctl Ab
M1M17627N
M1M17628N
мг/дл
100
80
60
40
20
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
Длительность лечения (в неделях)
Начало лечения

Фиг. 15


H4H12170P
H4H12166P
Изотипический контроль
Объект сравнения 1
Объект сравнения 2
400000
300000
200000
100000
0
AQP4Ab только
NoAQP4αB
RLU
−9 −8 −7 −6 −5
КОНЦЕНТРАЦИЯ LOG10 [M]

Фиг. 16