

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090275** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.11.30

(22) Дата подачи заявки
2015.03.06

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ C5 С УЛУЧШЕННЫМИ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ

(31) 61/949,932

(32) 2014.03.07

(33) US

(62) 201691764; 2015.03.06

(71) Заявитель:
**АЛЕКСИОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Эндрюен Брюс А., мл., Шеридан
Дуглас Л., Тамберини Пол П. (US)**

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

(57) В настоящем изобретении предложены выделенные антитела их его антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с компонентом комплемента C5 человека и ингибируют расщепление C5 на фрагменты C5a и C5b. Также предложены нуклеиновая кислота, кодирующая и полипептид тяжелой цепи, и полипептид легкой цепи указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, клетка, содержащая экспрессионный вектор, способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, терапевтический набор, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, готовое изделие. Кроме того, представлены способы лечения пациента, страдающего пароксизмальной ночной гемоглобинурией (ПНГ) или атипичным гемолитико-уремическим синдромом (аГУС), основанные на введении антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции.

A2

202090275

202090275

A2

**АНТИТЕЛА ПРОТИВ C5 С УЛУЧШЕННЫМИ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИМИ
ХАРАКТЕРИСТИКАМИ**

Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявке на патент США № 61/949932 (поданной 7 марта 2014 г.), описание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники

Изобретение относится к области медицины, иммунологии, молекулярной биологии и химии белков.

Уровень техники

Система комплемента функционирует в сочетании с другими иммунологическими системами организма, обеспечивая защиту от вторжения клеточных и вирусных патогенов. Существует по меньшей мере 25 белков комплемента, обнаруживаемых в виде комплексной системы белков плазмы и мембранных кофакторов. Белки плазмы составляют приблизительно 10% глобулинов в сыворотке позвоночных. Иммунные защитные функции компонентов комплемента достигаются за счет взаимодействия в ходе ряда сложных и при этом точных событий, связанных с ферментативным расщеплением и связыванием с мембранами. Итоговый каскад комплемента приводит к синтезу продуктов с опсонической, иммунорегуляторной и литической функциями. Краткий обзор видов биологической активности, связанных с активацией комплемента, приведен, например, в руководстве: The Merck Manual, 16 изд.

Каскад комплемента может развиваться через классический путь (CP), лектиновый путь или альтернативный путь (AP). Лектиновый путь, как правило, начинается со связывания маннозосвязывающего лектина (MBL) с субстратами с высоким содержанием маннозы. AP может быть антитело-независимым, и может инициироваться определенными молекулами на поверхности патогенов. CP, как правило, начинается с распознавания антитела и связывания с антигенной детерминантой на целевой клетке. Указанные пути сходятся на уровне конвертазы C3 – в момент расщепления компонента комплемента C3 активной протеазой с

образованием C3A и C3b.

Инициация конвертазы AP C3 происходит при спонтанном гидролизе компонента комплемента C3, который в избытке присутствует в плазменной фракции крови. Указанный процесс, также известный как «холостая активация», происходит за счет спонтанного расщепления тиоэфирной связи в C3 с образованием C3i или C3(H₂O). Холостой активации способствует присутствие поверхностей, поддерживающих связывание активированного C3 и/или имеющих нейтральный или положительный заряд (например, поверхность бактериальных клеток). Указанное образование C3(H₂O) обеспечивает связывание белка плазмы фактора В, что, в свою очередь, позволяет фактору D расщеплять фактор В на Va и Vb. Фрагмент Vb остается связанным с C3, образуя комплекс, содержащий C3(H₂O)Vb – «жидкофазную» или «инициирующую» конвертазу C3. Несмотря на то, что жидкофазная конвертаза C3 синтезируется в малых количествах, она способна расщеплять многие белки C3 на C3a и C3b и приводить к синтезу C3b и последующему ковалентному связыванию C3b с поверхностью (например, поверхностью бактерии). Фактор В, связанный с поверхностно-связанным C3b, расщепляется фактором D с образованием таким образом поверхностно-связанного комплекса конвертазы C3 AP, содержащего C3b, Vb. (См., например, Müller-Eberhard (1988) *Ann Rev Biochem* 57:321-347.)

AP-конвертаза C5 – (C3b)₂,Vb – образуется при добавлении второго мономера C3b к AP-конвертазе C3. (См., например, Medicus et al. (1976) *J Exp Med* 144:1076-1093 и Fearon et al. (1975) *J Exp Med* 142:856-863.) Роль второй молекулы C3b заключается в связывании и представлении C5 для расщепления Vb. (См., например, Isenman et al. (1980) *J Immunol* 124:326-331.) AP-конвертазы C3 и C5 стабилизируются при добавлении тримерного белка пропердина, как описано, например, у Medicus et al. (1976), *выше*. Тем не менее, связывание пропердина не требуется для формирования функционального альтернативного пути конвертазы C3 или C5. (См., например, Schreiber et al. (1978) *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 3948-3952 и Sissons et al. (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 559-562).

СР-конвертаза С3 образуется при взаимодействии компонента комплемента С1, который представляет собой комплекс С1q, С1r и С1s, с антителом, связанным с целевым антигеном (например, микробным антигеном). Связывание С1q-части С1 с комплексом антитело-антиген приводит к конформационному изменению С1, активирующему С1r. Затем активный С1r расщепляет С1-связанный С1s с образованием таким образом активной серинпротеазы. Активный С1s расщепляет компонент комплемента С4 на С4b и С4a. Как и С3b, вновь образующийся фрагмент С4b содержит высокореактивный тиол, легко образующий амидную или эфирную связь с подходящими молекулами на целевой поверхности (например, поверхности микробной клетки). С1s также расщепляет компонент комплемента С2 на С2b и С2a. Комплекс, образованный С4b и С2a, представляет собой СР-конвертазу С3, способную расщеплять С3 на С3a и С3b. СР-конвертаза С5 - С4b, С2a, С3b - образуется при добавлении мономера С3b к СР-конвертазе С3. (См., например, Müller-Eberhard (1988), *выше* и Cooper et al. (1970) *J Exp Med* 132:775-793.)

Помимо роли в образовании конвертаз С3 и С5, С3b также функционирует в качестве опсонина за счет взаимодействия с рецепторами комплемента, присутствующими на поверхности антигенпрезентирующих клеток, таких как макрофаги и дендритные клетки. Опсоническая функция С3b обычно считается наиболее важной из противоифекционных функций системы комплемента. Пациенты с генетическими дефектами, блокирующими функцию С3b, подвержены инфекциям, вызываемым широким спектром патогенных организмов, тогда как у пациентов с дефектами, обуславливающими нарушения на более поздних этапах каскада комплемента, т.е. пациентов с дефектами, блокирующими функции С5, наблюдается бóльшая подверженность исключительно инфекции *Neisseria*, при этом только незначительно более выраженная.

АР- и СР-конвертазы С5 расщепляют С5 на С5a и С5b. Расщепление С5 высвобождает С5a, мощный анафилотоксин и хемотаксический фактор, и С5b, который обеспечивает образование литического комплекса терминального каскада комплемента, С5b-9. С5b комбинируется с С6, С7 и С8 с образованием комплекса С5b-8

на поверхности целевой клетки. При связывании нескольких молекул C9 образуется мембраноатакующий комплекс (МАК, C5b-9, комплекс терминального каскада комплемента - ТКК). При включении достаточного количества МАК в мембраны целевых клеток формируемые ими отверстия (поры МАК) опосредуют быстрый осмотический лизис целевых клеток.

Правильно функционирующая система комплемента обеспечивает надежную защиту от микробных инфекций, тогда как неадекватная регуляция или активация путей комплемента, как было обнаружено, вовлечена в патогенез различных расстройств включая, например, ревматоидный артрит (РА); волчаночный нефрит; астму; ишемически-реперфузионное повреждение; атипичный гемолитико-уремический синдром (аГУС); болезнь плотного осадка (DDD); пароксизмальную ночную гемоглобинурию (ПНГ); макулярную дегенерацию (например, возрастную макулярную дегенерацию (ВМД)); гемолиз, повышение уровня ферментов печени и тромбоцитопению (HELLP-синдром); тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП); спонтанную потерю плода; слабоиммунный васкулит; буллезный эпидермолиз; рецидивирующую потерю плода; рассеянный склероз (МС); травматическое повреждение головного мозга; и повреждение в результате инфаркта миокарда, сердечно-легочного шунтирования и гемодиализа. (См., например, Holers et al. (2008) *Immunological Reviews* 223:300-316.) Понижающая регуляция активации комплемента, как было показано, эффективна при лечении некоторых заболеваний в различных моделях на животных. См., например, Rother t al. (2007) *Nature Biotechnology* 25(11):1256-1264; Wang et al. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8563-8568; Wang et al. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8955-8959; Rinder et al. (1995) *J Clin Invest* 96:1564-1572; Kroshus et al. (1995) *Transplantation* 60:1194-1202; Homeister et al. (1993) *J Immunol* 150:1055-1064; Weisman et al. (1990) *Science* 249:146-151; Amsterdam et al. (1995) *Am J Physiol* 268:H448-H457; и Rabinovici et al. (1992) *J Immunol* 149:1744 1750.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к антителам против C5,

отличающимся одной или большим количеством улучшенных характеристик, например, относительно известных антител против C5, применяемых в терапевтических целях. Например, описанные в настоящем документе антитела против C5 демонстрируют увеличенный период полувыведения из сыворотки относительно периода полувыведения из сыворотки экулизумаба. За счет улучшенных фармакокинетических свойств, описанные в настоящем документе антитела имеют ряд преимуществ, например, преимуществ по сравнению с другими антителами против C5, которые связываются с полноразмерным или зрелым C5 и ингибируют его расщепление. Наподобие аналогичных антител против C5, описанные в настоящем документе антитела способны ингибировать опосредованный C5a воспалительный ответ и C5b(MAK)-зависимый клеточный лизис, обусловленный расщеплением C5. Тем не менее, поскольку концентрация C5 в плазме человека составляет приблизительно 0,37 мкМ (Rawal and Pangburn (2001) *J Immunol* 166(4):2635-2642), для эффективного ингибирования C5 у человека часто необходимо применение высоких концентраций и/или частое введение таких антител против C5, как экулизумаб. В настоящем описании в рабочих примерах приведены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что, хотя антитела против C5 высокоэффективны для ингибирования комплемента *in vitro* и *in vivo* (см., например, Hillmen et al. (2004) *N Engl J Med* 350(6):552), указанные антитела, в частности, подвержены опосредованному мишенью выведению, обусловленному высокой концентрацией C5 в крови. В настоящем описании также показано, что новые антитела, описанные в настоящем документе, отличаются пониженной предрасположенностью к опосредованному мишенью выведению и, соответственно, имеют более продолжительный период полувыведения из сыворотки крови (период полувыведения) по сравнению с уже известными антителами против C5.

Ввиду более продолжительного периода полувыведения описанные в настоящем документе антитела можно вводить человеку в значительно меньшей дозировке и/или с меньшей частотой по сравнению с уже известными антителами против C5 (такими как экулизумаб) и эффективно обеспечивают такой же или более

высокий уровень ингибирования C5 у человека. Возможность введения меньшей дозы антитела по сравнению, например, с дозой экулизумаба, также позволяет использовать дополнительные способы введения, такие как, например, подкожное введение, внутримышечное введение, внутрилегочное введение и введение с помощью применения биоразлагаемых микросфер.

Соответственно, согласно одному аспекту настоящим изобретением предусмотрено антитело против C5, отличающееся одной или большим количеством улучшенных характеристик (например, улучшенными фармакокинетическими свойствами) относительно экулизумаба. Указанное антитело или его C5-связывающий фрагмент является таким, что: (a) связывается с компонентом комплемента C5; (b) ингибирует расщепление C5 на фрагменты C5a и C5b; и (c) содержит: (i) область CDR1 тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:1, (ii) область CDR2 тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:2, (iii) область CDR3 тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:3, (iv) область CDR1 легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:4, (v) область CDR2 легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:5, и (vi) область CDR3 легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:6, где по меньшей мере одна (например, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь или по меньшей мере восемь) аминокислот(ы) по (i)-(vi) заменена на другую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации указанный C5 представляет собой C5 человека.

Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, по меньшей мере одна аминокислота области CDR1 тяжелой цепи заменена на другую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации

любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, по меньшей мере одна аминокислота области CDR2 тяжелой цепи заменена на другую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, по меньшей мере одна аминокислота области CDR3 тяжелой цепи заменена на другую аминокислоту.

Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, по меньшей мере одна аминокислота области CDR1 легкой цепи заменена на другую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, глицина в положении 8 последовательности SEQ ID NO:4 заменен на другую аминокислоту (например, гистидин).

Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, по меньшей мере одна аминокислота области CDR2 легкой цепи заменена на другую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, по меньшей мере одна аминокислота области CDR3 легкой цепи заменена на другую аминокислоту.

Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, осуществляется замена в положении аминокислоты, выбранном из группы, состоящей из: глицина в положении 1 последовательности SEQ ID NO:1, тирозина в положении 2 последовательности SEQ ID NO:1, изолейцина в положении 3 последовательности SEQ ID NO:1, фенилаланина в положении 4 последовательности SEQ ID NO:1, серина в положении 5 последовательности SEQ ID NO:1, аспарагина в положении 6 последовательности SEQ ID NO:1, тирозина в положении 7 последовательности SEQ ID NO:1, триптофана в положении 8 последовательности SEQ ID NO:1, изолейцина в положении 9 последовательности SEQ ID NO:1, глутамина в положении 10 последовательности SEQ ID NO:1, глутаминовой кислоты в положении 1 последовательности SEQ ID NO:2, изолейцина в положении 2 последовательности SEQ ID NO:2,

лейцина в положении 3 последовательности SEQ ID NO:2, пролина в положении 4 последовательности SEQ ID NO:2, глицина в положении 5 последовательности SEQ ID NO:2, серина в положении 6 последовательности SEQ ID NO:2, глицина в положении 7 последовательности SEQ ID NO:2, серина в положении 8 последовательности SEQ ID NO:2, треонина в положении 9 последовательности SEQ ID NO:2, глутаминовой кислоты в положении 10 последовательности SEQ ID NO:2, тирозина в положении 11 последовательности SEQ ID NO:2, треонина в положении 12 последовательности SEQ ID NO:2, глутаминовой кислоты в положении 13 последовательности SEQ ID NO:2, аспарагина в положении 14 последовательности SEQ ID NO:2, фенилаланина в положении 15 последовательности SEQ ID NO:2, лизина в положении 16 последовательности SEQ ID NO:2, аспарагиновой кислоты в положении 17 последовательности SEQ ID NO:2, тирозина в положении 1 последовательности SEQ ID NO:3, фенилаланина в положении 2 последовательности SEQ ID NO:3, фенилаланина в положении 3 последовательности SEQ ID NO:3, глицина в положении 4 последовательности SEQ ID NO:3, серина в положении 5 последовательности SEQ ID NO:3, серина в положении 6 последовательности SEQ ID NO:3, пролина в положении 7 последовательности SEQ ID NO:3, аспарагина в положении 8 последовательности SEQ ID NO:3, триптофана в положении 9 последовательности SEQ ID NO:3, тирозина в положении 10 последовательности SEQ ID NO:3, фенилаланина в положении 11 последовательности SEQ ID NO:3, аспарагиновой кислоты в положении 12 последовательности SEQ ID NO:3 и валина в положении 13 последовательности SEQ ID NO:3.

Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, осуществляется замена в положении аминокислоты, выбранном из группы, состоящей из: глицина в положении 8 последовательности SEQ ID NO:4, лейцина в положении 10 последовательности SEQ ID NO:4, валина в положении 3 последовательности SEQ ID NO:6 и треонина в положении 6 последовательности SEQ ID NO:6.

Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител

или фрагментов, описанных в настоящем документе, осуществляется замена в положении аминокислоты, выбранном из группы, состоящей из: тирозина в положении 2 последовательности SEQ ID NO:1, изолейцина в положении 9 последовательности SEQ ID NO:1, лейцина в положении 3 последовательности SEQ ID NO:2 и серина в положении 8 последовательности SEQ ID NO:2.

Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, как тирозин в положении 2 последовательности SEQ ID NO:1, так и лейцин в положении 3 последовательности SEQ ID NO:2 заменены на другую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, указанная другая аминокислота представляет собой гистидин.

Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, как изолейцин в положении 9 последовательности SEQ ID NO:1, так и серин в положении 8 последовательности SEQ ID NO:2 заменены на другую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, как изолейцин в положении 9 последовательности SEQ ID NO:1, так и лейцин в положении 3 последовательности SEQ ID NO:2 заменены на другую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, указанная другая аминокислота представляет собой гистидин.

Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, как тирозин в положении 2 последовательности SEQ ID NO:1, так и серин в положении 8 последовательности SEQ ID NO:2 заменены на другую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит комбинацию замен аминокислот, выбранных из Таблицы 1. Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, указанная другая аминокислота представляет собой гистидин.

Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, указанная комбинация замен аминокислот включает: (i) замену другой аминокислотой глицина в положении 8 последовательности SEQ ID NO:4 в полипептиде легкой цепи указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; (ii) замену другой аминокислотой глицина в положении 2 последовательности SEQ ID NO:1 в полипептиде тяжелой цепи указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и (iii) замену другой аминокислотой серина в положении 8 последовательности SEQ ID NO:2 в полипептиде тяжелой цепи указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, указанная другая аминокислота представляет собой гистидин.

Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, тирозин в положении 2 последовательности SEQ ID NO:1 и серин в положении 8 последовательности SEQ ID NO:2 заменены на гистидин. Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, указанная другая аминокислота представляет собой гистидин.

Согласно некоторым вариантам реализации любые антитела или фрагменты, описанные в настоящем документе, связываются с C5 при значении pH 7,4 и температуре 25°C с константой диссоциации аффинной связи (K_D) в диапазоне $0,1 \text{ нМ} \leq K_D \leq 1 \text{ нМ}$. Согласно некоторым вариантам реализации любые антитела или фрагменты, описанные в настоящем документе, связываются с C5 при значении pH 7,4 и температуре 25°C с K_D в диапазоне $0,2 \text{ нМ} \leq K_D \leq 1 \text{ нМ}$. Согласно некоторым вариантам реализации любые антитела или фрагменты, описанные в настоящем документе, связываются с C5 при значении pH 7,4 и температуре 25°C с K_D в диапазоне $0,5 \text{ нМ} \leq K_D \leq 1 \text{ нМ}$.

Согласно некоторым вариантам реализации любые антитела или фрагменты, описанные в настоящем документе, связываются с C5

при значении рН 6,0 и 25°C с K_D , составляющей ≥ 1 нМ (например, ≥ 50 нМ ≥ 100 нМ, или ≥ 1 мкМ).

Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, отношение [$(K_D$ указанного антитела к С5 или его антигенсвязывающего фрагмента при значении рН 6,0 и при температуре 25°C) / (K_D указанного антитела к С5 или его антигенсвязывающего фрагмента при значении рН 7,4 и при температуре 25°C)] превышает 25. Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, отношение [$(K_D$ указанного антитела к С5 или его антигенсвязывающего фрагмента при значении рН 6,0 и при температуре 25°C) / (K_D указанного антитела к С5 или его антигенсвязывающего фрагмента при значении рН 7,4 и при температуре 25°C)] превышает 100 (например, превышает 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1500, 1600, 1800, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000 или 8500).

Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, K_D указанного антитела к С5 или его антигенсвязывающего фрагмента при значении рН 7,4 и при температуре 25°C составляет менее чем 1 (например, менее чем 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; или 0,1) нМ.

Основываясь на характеристизации нескольких вариантов молекул экулизумаба, как описано в рабочих примерах, авторы настоящего изобретения обнаружили новый род антител с улучшенными фармакокинетическими свойствами по сравнению с экулизумабом. Сродство к С5 входящих в указанный род антител меньше сродства экулизумаба к С5 при значении рН 7,4. При этом указанные антитела отличаются константой диссоциации аффинной связи (K_D) с С5 при значении рН 7,4, составляющей 1 нМ или менее. Без связи настоящего изобретения с какой-либо конкретной теорией или механизмом действия авторы настоящего изобретения предполагают, что незначительное уменьшение сродства экулизумаба к С5 при значении рН 7,4 и последующий эффект на

аффинность антитела к C5 при значении pH 6,0 при поддержании идентичного/аналогичного отношения аффинности при pH 7,4 и pH 6,0, по существу уменьшает опосредованное C5 выведение антитела, при этом по существу не влияя на ингибирующую функцию полученного антитела на комплемент у пациентов. Соответственно, авторы настоящего изобретения определили диапазон оптимальной аффинности для антител против C5, обеспечивающей улучшенные фармакокинетические свойства по сравнению с экулизумабом при сохранении требуемых фармакодинамических характеристик. Соответственно, в другом аспекте настоящим изобретением предусмотрено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый): (a) связывается с компонентом комплемента C5 при значении pH 7,4 и температуре 25°C с константой диссоциации аффинной связи (K_D), составляющей ≤ 1 нМ; (b) связывается с C5 при значении pH 6,0 и 25°C с K_D , составляющей не более 10 нМ; (c) ингибирует расщепление C5 на фрагменты C5a и C5b, при этом отношение [$(K_D$ указанного антитела к C5 или его антигенсвязывающего фрагмента при значении pH 6,0 и 25°C)/(K_D указанного антитела к C5 или его антигенсвязывающего фрагмента при значении pH 7,4 и температуре 25°C)] составляет 25 или более.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с C5 при значении pH 7,4 и температуре 25°C с константой диссоциации аффинной связи (K_D) в диапазоне $0,1 \text{ нМ} \leq K_D \leq 1 \text{ нМ}$. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с C5 при значении pH 7,4 и температуре 25°C с K_D в диапазоне $0,2 \text{ нМ} \leq K_D \leq 1 \text{ нМ}$. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с C5 при значении pH 7,4 и температуре 25°C с K_D в диапазоне $0,5 \text{ нМ} \leq K_D \leq 1 \text{ нМ}$. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с C5 при значении pH 6,0 и 25°C с K_D , составляющей $\geq 1 \text{ нМ}$. Согласно некоторым

вариантам реализации указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с C5 при значении pH 6,0 и 25°C с K_D , составляющей ≥ 50 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с C5 при значении pH 6,0 и 25°C с K_D , составляющей ≥ 100 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с C5 при значении pH 6,0 и 25°C с K_D , составляющей ≥ 1 мкМ.

Согласно некоторым вариантам реализации отношение $[(K_D \text{ указанного антитела к C5 или его антигенсвязывающего фрагмента при значении pH 6,0 и при температуре 25°C}) / (K_D \text{ указанного антитела к C5 или его антигенсвязывающего фрагмента при значении pH 7,4 и при температуре 25°C})]$ превышает 50 (например, превышает 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000 или 8500).

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с C5 при значении pH 7,4 и при температуре 25°C с $K_D < 1$ нМ. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с C5 при значении pH 7,4 и при температуре 25°C с $K_D < 0,8$ нМ. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с C5 при значении pH 7,4 и при температуре 25°C с $K_D < 0,5$ нМ. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с C5 при значении pH 7,4 и при температуре 25°C с $K_D < 0,2$ нМ.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) область CDR1 тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:1, (ii) область CDR2

тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:2, (iii) область CDR3 тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:3, (iv) область CDR1 легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:4, (v) область CDR2 легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:5, и (vi) область CDR3 легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:6, где по меньшей мере одна аминокислота по (i)-(vi) заменена на другую аминокислоту. Указанная другая аминокислота может представлять собой любую аминокислоту (например, гистидин). Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере одна аминокислота области CDR1 тяжелой цепи заменена на другую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере одна аминокислота области CDR2 тяжелой цепи заменена на другую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере одна аминокислота области CDR3 тяжелой цепи заменена на другую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере одна аминокислота области CDR1 легкой цепи заменена на другую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере одна аминокислота области CDR2 легкой цепи заменена на другую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере одна аминокислота области CDR3 легкой цепи заменена на другую аминокислоту.

Согласно некоторым вариантам реализации осуществляется замена в положении аминокислоты, выбранном из группы, состоящей из: глицина в положении 8 последовательности SEQ ID NO:4, лейцина в положении 10 последовательности SEQ ID NO:4, валина в положении 3 последовательности SEQ ID NO:6 и треонина в положении 6 последовательности SEQ ID NO:6. Согласно некоторым вариантам реализации осуществляется замена в положении аминокислоты, выбранном из группы, состоящей из: тирозина в положении 2 последовательности SEQ ID NO:1, изолейцина в

положении 9 последовательности SEQ ID NO:1, лейцина в положении 3 последовательности SEQ ID NO:2 и серина в положении 8 последовательности SEQ ID NO:2. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит комбинацию замен аминокислот, выбранных из Таблицы 1.

Согласно некоторым вариантам реализации комбинация замен аминокислот, введенных в области CDR, включает: (i) замену другой аминокислотой глицина в положении 8 последовательности SEQ ID NO:4 в полипептиде легкой цепи указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; (ii) замену другой аминокислотой глицина в положении 2 последовательности SEQ ID NO:1 в полипептиде тяжелой цепи указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и (iii) замену другой аминокислотой серина в положении 8 последовательности SEQ ID NO:2 в полипептиде тяжелой цепи указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Согласно некоторым вариантам реализации комбинация замен аминокислот включает: (i) замену другой аминокислотой глицина в положении 2 последовательности SEQ ID NO:1 в полипептиде тяжелой цепи указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и (ii) замену другой аминокислотой серина в положении 8 последовательности SEQ ID NO:2 в полипептиде тяжелой цепи указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Согласно некоторым вариантам реализации тирозин в положении 2 последовательности SEQ ID NO:1 и серин в положении 8 относительно SEQ ID NO:2 заменены (например, на гистидин).

Согласно некоторым вариантам реализации любые антитела или их фрагменты содержат вариант константной области Fc человека (например, вариант константной области Fc IgG человека), который связывается с неонатальным Fc-рецептором человека (FcRn) с большим сродством по сравнению с природной константной областью Fc человека, из которой происходит указанный вариант константной области Fc человека. Указанный вариант константной области Fc может содержать один или большее количество (например, два, три, четыре или пять или более) замен

аминокислот относительно природной константной области Fc человека, из которой происходит указанный вариант константной области Fc человека. Замена может осуществляться, например, в положении аминокислоты 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434 или 436 (нумерация EU) относительно природной константной области Fc человека. Указанная замена может быть выбрана из группы, состоящей из: замены метионином глицина в положении 237; замены аланином пролина в положении 238; замены лизином серина в положении 239; замены изолейцином лизина в положении 248; замены аланином, фенилаланином, изолейцином, метионином, глутамином, серином, валином, триптофаном или тирозином треонина в положении 250; фенилаланином, триптофаном или тирозином метионина в положении 252; замены треонином серина в положении 254; глутаминовой кислотой аргинина в положении 255; аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой или глутамином треонина в положении 256; аланином, глицином, изолейцином, лейцином, метионином, аспарагином, серином, треонином или валином пролина в положении 257; гистидином глутаминовой кислоты в положении 258; замены аланином аспарагиновой кислоты в положении 265; фенилаланином аспарагиновой кислоты в положении 270; аланином или глутаминовой кислотой аспарагина в положении 286; замены гистидином треонина в положении 289; замены аланином аспарагина в положении 297; замены глицином серина в положении 298; замены аланином валина в положении 303; замены аланином валина в положении 305; аланином, аспарагиновой кислотой, фенилаланином, глицином, гистидином, изолейцином, лизином, лейцином, метионином, аспарагином, пролином, глутамином, аргинином, серином, валином, триптофаном или тирозином треонина в положении 307; аланином, фенилаланином, изолейцином, лейцином, метионином, пролином, глутамином или треонином валина в положении 308; аланином, аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой, пролином или аргинином лейцина или валина в положении 309; аланином, гистидином или

изолейцином глутамина в положении 311; аланином или гистидином аспарагиновой кислоты в положении 312; лизином или аргинином лейцина в положении 314; аланином или гистидином аспарагина в положении 315; замены аланином лизина в положении 317; замены глицином аспарагина в положении 325; замены валином изолейцина в положении 332; замены лейцином лизина в положении 334; замены гистидином лизина в положении 360; замены аланином аспарагиновой кислоты в положении 376; замены аланином глутаминовой кислоты в положении 380; замены аланином глутаминовой кислоты в положении 382; замены аланином аспарагина или серина в положении 384; аспарагиновой кислотой или гистидином глицина в положении 385; замены пролином глутамина в положении 386; и замены глутаминовой кислотой пролина в положении 387; замены аланином или серином аспарагина в положении 389; замены аланином серина в положении 424; аланином, аспарагиновой кислотой, фенилаланином, глицином, гистидином, изолейцином, лизином, лейцином, аспарагином, пролином, глутамином, серином, треонином, валином, триптофаном или тирозином метионина в положении 428; замены лизином гистидина в положении 433; аланином, фенилаланином, гистидином, серином, триптофаном или тирозином аспарагина в положении 434; и замены гистидином тирозина или фенилаланина в положении 436; все положения соответствуют нумерации EU.

Согласно некоторым вариантам реализации любых антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, вариант константной области Fc человека содержит метионин в положении 428 и аспарагин в положении 434, при этом оба положения соответствуют нумерации EU.

Согласно некоторым вариантам реализации любые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут содержать или состоять из полипептида тяжелой цепи, содержащего последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:12 или 14, и полипептида легкой цепи, содержащего последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:8 или 11.

Указанным изобретением также предусмотрено антитело,

содержащее переменную область тяжелой цепи экулизумаба (SEQ ID NO:7) или области CDR тяжелой цепи экулизумаба (SEQ ID NO:1-3) и любой вариант константной области Fc человека, как раскрыто в настоящем документе, например, вариант константной области Fc человека, содержащий метионин в положении 428 и аспарагин в положении 434, при этом оба положения соответствуют нумерации EU.

Согласно одному варианту реализации указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент отличается увеличенным периодом полувыведения у человека относительно периода полувыведения экулизумаба в сыворотке. Период полувыведения в настоящем документе определен как время, необходимое для уменьшения концентрации в плазме содержащего антитело лекарственного средства в организме наполовину, или на 50%. Указанное уменьшение на 50% концентрации в сыворотке отражает количество циркулирующего лекарственного средства, не устраняемого за счет природных способов выведения антител. Период полувыведения экулизумаба, как было определено, составляет $272 + 82$ ч или 11,3 дней у пациентов PNH и 12,1 дней у пациентов с aГUC (см. инструкцию по применению Soliris). Период полувыведения у человека антител или фрагментов, как описано в настоящем документе, может быть увеличен относительно периода полувыведения экулизумаба у человека. Период полувыведения может быть увеличен по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 2,5 раза или по меньшей мере в 3 раза относительно периода полувыведения экулизумаба.

Согласно некоторым вариантам реализации любых из антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, антитело имеет период полувыведения из сыворотки человека, который превышает или составляет по меньшей мере 10 дней (например, превышает, или по меньшей мере, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 дней). Указанный период полувыведения (или удлинение периода полувыведения относительно экулизумаб) может, согласно некоторым вариантам реализации, обеспечиваться антителом, описанным в настоящем документе, содержащим

встречающуюся в природе константную область человека Fc. Согласно некоторым вариантам реализации измеряют период полувыведения относительно периода полувыведения антитела, содержащего вариант константной области Fc человека, описанный в настоящем документе. Период полувыведения у человека антител или фрагментов, описанных в настоящем документе, может быть увеличен относительно периода полувыведения экулизумаба у человека. Период полувыведения описанного в настоящем документе антитела у человека составляет по меньшей мере 25 дней, по меньшей мере 26 дней, по меньшей мере 27 дней, по меньшей мере 28 дней, по меньшей мере 29 дней, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 31 день, по меньшей мере 32 дня, по меньшей мере 33 дня, по меньшей мере 34 дня или по меньшей мере 35 дней.

Согласно некоторым вариантам реализации любые антитела или фрагменты, описанные в настоящем документе, гуманизированы, полностью принадлежат человеку, деиммунизированы или являются гибридными. Согласно некоторым вариантам реализации антитело или его фрагмент, раскрытые в настоящем документе, может представлять собой, например, рекомбинантное антитело, одноцепочечное антитело, диатело, интраантитело, Fv-фрагмент, Fd-фрагмент, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент и F(ab')₂-фрагмент.

Согласно некоторым вариантам реализации любые антитела или их фрагменты, описанные в настоящем документе, могут содержать гетерологичный фрагмент, например, сахар. Например, указанное антитело или его фрагмент может быть гликозилирован. Указанный гетерологичный фрагмент может также представлять собой детектируемую метку, например, флуоресцентную метку, люминесцентную метку, метку с тяжелым металлом, радиоактивную метку или ферментативную метку.

Согласно некоторым вариантам реализации любые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть синтезированы в клетке CHO. Согласно некоторым вариантам реализации указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты не содержат детектируемых остатков сиаловой кислоты.

Согласно некоторым вариантам реализации любые антитела или

их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть модифицированы фрагментом, улучшающим что-либо одно или более из: (а) стабилизации указанного антителя или его антигенсвязывающего фрагмента в кровотоке и (b) удержания указанного антителя или его антигенсвязывающего фрагмента в кровотоке. Такой фрагмент может содержать ПЭГ (пегилирование).

Согласно еще одному аспекту настоящим изобретением предусмотрена нуклеиновая кислота, которая кодирует что-либо одно или более из полипептидов тяжелых и легких цепей любых антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе. Также предусмотрены вектор (например, клонирующий или экспрессионный вектор), содержащий нуклеиновую кислоту, и клетка (например, клетка насекомого, бактериальная клетка, грибная клетка или клетка млекопитающего), содержащая указанный вектор. В настоящем изобретении также предложен способ получения любых антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе. Указанные способы необязательно включают получение описанной выше клетки (или культуры клеток), содержащей экспрессионный вектор (интегрированный или экстрахромосомный), содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует что-либо одно или более из полипептидов тяжелых и легких цепей любых антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе. Клетку или культуру клеток культивируют в условиях и на протяжении времени, достаточного для обеспечения экспрессии указанной клеткой (или культурой клеток) указанного антителя или его антигенсвязывающего фрагмента, кодируемого указанной нуклеиновой кислотой. Указанный способ также может включать выделение указанного антителя или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки (или клеток культуры) или из среды, в которой культивировали указанную клетку или клетки.

В другом аспекте настоящим изобретением предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и одно(один) или большее количество любых антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в

настоящем документе.

В другом аспекте настоящим изобретением предусмотрен терапевтический набор, содержащий: (i) одно(один) или большее количество любых антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, и (ii) средство для доставки указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента человеку. Указанное средство может представлять собой, например, шприц или насос.

Согласно еще одному аспекту настоящим изобретением предусмотрено готовое изделие, включающее контейнер, содержащий этикетку и одно или большее количество любых антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, при этом этикетка указывает на то, что указанная композиция предназначена для введения человеку, у которого имеется комплемент-ассоциированное состояние, предположительно имеется комплемент-ассоциированное состояние или имеется риск развития комплемент-ассоциированного состояния. Указанное готовое изделие может также содержать один или большее количество дополнительных активных терапевтических агентов для применения при лечении человека у которого имеется комплемент-ассоциированное состояние, предположительно имеется комплемент-ассоциированное состояние или имеется риск развития комплемент-ассоциированного состояния.

В другом аспекте настоящим изобретением предусмотрен способ лечения пациента, страдающего комплемент-ассоциированным состоянием, включающий введение указанному пациенту одного или большего количества любых антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, в количестве, эффективном для лечения указанного комплемент-ассоциированного состояния. Указанное комплемент-ассоциированное состояние может быть, например, выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита, синдрома антифосфолипидных антител, волчаночного нефрита, ишемически-реперфузионного повреждения, атипичного гемолитико-уремического синдрома, типичного гемолитико-уремического синдрома, пароксизмальной ночной гемоглобинурии, болезни плотного осадка, нейромиелита зрительного нерва,

мультифокальной двигательной нейропатии, рассеянного склероза, макулярной дегенерации, HELLP-синдрома, спонтанной потери плода, тромботической тромбоцитопенической пурпуры, слабоиммунного васкулита, буллезного эпидермолиза, рецидивирующей потери плода, травматического повреждения головного мозга, миокардита, цереброваскулярного расстройства, расстройства периферических сосудов, реноваскулярного расстройства, заболевания сосудов брыжейки/ЖКТ, васкулита, нефрита при пурпуре Шенлейна-Геноха, ассоциированного с системной красной волчанкой васкулита, связанного с ревматоидным артритом васкулита, васкулита с иммунными комплексами, синдрома Такаясу, дилатационной кардиомиопатии, диабетической ангиопатии, болезни Кавасаки, венозной газовой эмболии, рестеноза после размещения стента, ротационной атерэктомии, чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики, тяжелой миастении, болезни холодовой агглютинации, дерматомиозита, пароксизмальной холодовой гемоглобинурии, антифосфолипидного синдрома, болезни Грейвса, атеросклероза, болезни Альцгеймера, сепсиса при системной воспалительной реакции, септического шока, повреждения спинного мозга, гломерулонефрита, отторжения трансплантата (например, трансплантата почки), тиреоидита Хашимото, диабета I типа, псориаза, пузырчатки, аутоиммунной гемолитической анемии, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, синдрома Гудпасчера, болезни Дегоса и катастрофического антифосфолипидного синдрома.

В настоящем документе термин «антитело» относится к целому антителу, содержащему два полипептида легких цепей и два полипептида тяжелых цепей. Целые антитела включают антитела разных изотипов, включая антитела IgM, IgG, IgA, IgD и IgE. Термин «антитело» включает поликлональное антитело, моноклональное антитело, химеризованное или гибридное антитело, гуманизированное антитело, приматизированное антитело, деиммунизированное антитело и полностью принадлежащее человеку антитело. Указанное антитело может быть синтезировано или происходить из любого из различных видов, например,

млекопитающего, такого как человек, не являющиеся человеком приматы (например, орангутан, павиан или шимпанзе), лошади, рогатый скот, свиньи, овцы, козы, собаки, кошки, кролики, морские свинки, песчанки, хомяковые, крысы и мыши. Указанное антитело может представлять собой очищенное или рекомбинантное антитело.

В настоящем документе термин «фрагмент антитела», «антигенсвязывающий фрагмент» или аналогичные термины относятся к фрагменту антитела, сохраняющему способность связываться с целевым антигеном (например, С5 человека) и ингибировать активность целевого антигена. Такие фрагменты включают, например, одноцепочечное антитело, одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv), Fd-фрагмент, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент или F(ab')₂-фрагмент. scFv-фрагмент представляет собой одиночную полипептидную цепь, которая включает переменные области как тяжелых, так и легких цепей антитела, из которого происходит scFv. Кроме того, интраантитела, миниантитела, триатела и диатела также включены в определение антитела и подходят для применения в способах, описанных в настоящем документе. См., например, источники: Todorovska et al. (2001) *J Immunol Methods* 248(1):47-66; Hudson and Kortt (1999) *J Immunol Methods* 231(1):177-189; Poljak (1994) *Structure* 2(12):1121-1123; Rondon and Marasco (1997) *Annual Review of Microbiology* 51:257-283, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

В настоящем документе термин «фрагмент антитела» также включает, например, однодоменные антитела, такие как камелизированные однодоменные антитела. См., например, Muyldermans et al. (2001) *Trends Biochem Sci* 26:230-235; Nuttall et al. (2000) *Curr Pharm Biotech* 1:253-263; Reichmann et al. (1999) *J Immunol Meth* 231:25-38; опубликованные РСТ-заявки WO 94/04678 и WO 94/25591; и патент США № 6005079, все из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложены однодоменные антитела, содержащие два домена VH с модификациями, обеспечивающими образование

однодоменных антител.

Согласно определенному варианту реализации антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область полипептида тяжелой цепи и переменную область полипептида легкой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, содержит области CDR легкой цепи и полипептид тяжелой цепи антитела.

Если не указано иное, все технические и научные термины в настоящем документе имеют значения, обычно подразумеваемое специалистом в области техники, к которой относится указанное изобретение. Предпочтительные способы и материалы описаны ниже, хотя аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе способы и материалы также можно применять при практической реализации или тестировании раскрытых в настоящем описании способов и композиций. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие упоминаемые в настоящем документе источники полностью включены в него посредством ссылок.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения, например, способы лечения или предотвращения комплемент-ассоциированного состояния, станут очевидны из приведенных ниже описания, примеров и формулы изобретения.

Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO:1 соответствует последовательности аминокислот области CDR1 тяжелой цепи экулизумаба (в соответствии с комбинированным определением Kabat-Chothia).

SEQ ID NO:2 соответствует последовательности аминокислот области CDR2 тяжелой цепи экулизумаба (в соответствии с определением Kabat).

SEQ ID NO:3 соответствует последовательности аминокислот области CDR3 тяжелой цепи экулизумаба (в соответствии с комбинированным определением Kabat).

SEQ ID NO:4 соответствует последовательности аминокислот области CDR1 легкой цепи экулизумаба (в соответствии с определением Kabat).

SEQ ID NO:5 соответствует последовательности аминокислот

области CDR2 легкой цепи экулизумаба (в соответствии с определением Kabat).

SEQ ID NO:6 соответствует последовательности аминокислот области CDR3 легкой цепи экулизумаба (в соответствии с определением Kabat).

SEQ ID NO:7 соответствует последовательности аминокислот вариабельной области тяжелой цепи экулизумаба.

SEQ ID NO:8 соответствует последовательности аминокислот вариабельной области легкой цепи экулизумаба и антитела BNJ441.

SEQ ID NO:9 соответствует последовательности аминокислот константной области тяжелой цепи экулизумаба.

SEQ ID NO:10 соответствует последовательности аминокислот полной тяжелой цепи экулизумаба.

SEQ ID NO:11 соответствует последовательности аминокислот полной легкой цепи экулизумаба и антитела BNJ441.

SEQ ID NO:12 соответствует последовательности аминокислот вариабельной области тяжелой цепи антитела BNJ441.

SEQ ID NO:13 соответствует последовательности аминокислот константной области тяжелой цепи антитела BNJ441.

SEQ ID NO:14 соответствует последовательности аминокислот полной тяжелой цепи антитела BNJ441.

SEQ ID NO:15 соответствует последовательности аминокислот варианта константной области тяжелой цепи IgG2, содержащего замены YTE.

SEQ ID NO:16 соответствует последовательности аминокислот полной тяжелой цепи варианта экулизумаба, содержащей константную область тяжелой цепи, приведенную в последовательности SEQ ID NO:15 (выше).

SEQ ID NO:17 соответствует последовательности аминокислот области CDR1 легкой цепи экулизумаба (в соответствии с определением Kabat) с заменой глицина на гистидин в положении 8 последовательности SEQ ID NO:4.

SEQ ID NO:18 соответствует последовательности аминокислот вариабельной области легкой цепи антитела ENG303.

SEQ ID NO:19 соответствует последовательности аминокислот области CDR2 тяжелой цепи экулизумаба, в которой серин в

положении 8 последовательности SEQ ID NO:2 заменен на гистидин.

SEQ ID NO:20 соответствует последовательности аминокислот так называемой метки «FLAG».

SEQ ID NO:21 соответствует полигистидиновой последовательности, обычно используемой в качестве антигенной метки.

SEQ ID NO:22 соответствует последовательности аминокислот так называемой гемагглютининовой метки.

SEQ ID NO:23 соответствует последовательности аминокислот области CDR1 тяжелой цепи экулизумаба, где тирозин в положении 2 (последовательности SEQ ID NO:1) заменен на гистидин.

SEQ ID NO:24 соответствует последовательности аминокислот полипептида тяжелой цепи антитела ENG303.

SEQ ID NO:25 соответствует последовательности аминокислот полипептида легкой цепи антитела ENG303.

SEQ ID NO: 26 соответствует последовательности аминокислот полипептида тяжелой цепи антитела ENL049.

SEQ ID NO: 27 соответствует последовательности аминокислот полипептида легкой цепи антитела ENL049.

SEQ ID NO:28 соответствует последовательности аминокислот полипептида тяжелой цепи ENL000.

SEQ ID NO:29 соответствует последовательности аминокислот полипептида легкой цепи антитела ENL000.

SEQ ID NO:30 соответствует последовательности аминокислот полипептида легкой цепи BHL006.

SEQ ID NO:31 соответствует последовательности аминокислот полипептида тяжелой цепи антитела BHL006.

SEQ ID NO:32 соответствует последовательности аминокислот полипептида легкой цепи антитела BHL009.

SEQ ID NO:33 соответствует последовательности аминокислот тяжелой цепи антитела BHL009.

SEQ ID NO:34 соответствует последовательности аминокислот легкой цепи антитела BHL0011.

SEQ ID NO:35 соответствует последовательности аминокислот тяжелой цепи антитела BHL011.

Краткое описание чертежей

На Фиг. 1 приведена линейная диаграмма, отражающая выведение экулизумаба из сыворотки трансгенных по FcRn человека мышей в присутствии или в отсутствие экзогенного C5 человека. Ось Y отражает процент остающегося в сыворотке антитела, а ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 2 приведена линейная диаграмма, отражающая выведение варианта экулизумаба, содержащего константную область IgG2 (Есу-IgG2), и антитела Есу-IgG2, содержащего замены YTE (Есу-IgG2(YTE)), из сыворотки мышей. Ось Y отражает процент остающегося в сыворотке антитела, а ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 3 приведена линейная диаграмма, отражающая выведение варианта экулизумаба, содержащего константную область IgG2 (Есу-IgG2), и антитела Есу-IgG2, содержащего замены YTE (Есу-IgG2(YTE)) из сыворотки мышей. Указанные эксперименты проводили в присутствии или в отсутствие экзогенного C5 человека. Ось Y отражает процент остающегося в сыворотке антитела, а ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 4 приведена сенсограмма, отражающая кинетику связывания (при значении pH 7,4) и диссоциации (при значении pH 7,4 и pH 6,0) для трех антител против C5: ENL000, ENG303 и ENL049. Значения на оси Y приведены в условных единицах, а ось X отражает продолжительность периодов времени (в секундах).

На Фиг. 5А приведена сенсограмма, отражающая кинетику диссоциации при значении pH 7,4 и pH 6,0 для антитела ENG303 (двойная замена Y27H-S57H), варианта экулизумаба с единственной заменой Y27H, и экулизумаба (есу; Ес293F). Значения на оси Y приведены в нанометрах (нм), а ось X отражает продолжительность периодов времени (в секундах).

На Фиг. 5В приведена сенсограмма, отражающая кинетику диссоциации при значении pH 7,4 и pH 6,0 для антитела ENG304 (двойная замена I34H-L52H), варианта экулизумаба с единственной заменой I34H, и экулизумаба (есу; Ес293F). Значения на оси Y приведены в нанометрах (нм), а ось X отражает продолжительность периодов времени (в секундах). Антитело ENG304 не соответствует

второму пороговому значению для отбора – а именно, превышено значение максимально допустимой дисперсии (для экулизумаба) для диссоциации при значении pH 7,4.

На Фиг. 5C приведена сенсограмма, отражающая кинетику диссоциации при значении pH 7,4 и pH 6,0 для антитела ENG303 (двойная замена Y27H-S57H) и экулизумаба (есу; Ес293F). Значения на оси Y приведены в нанометрах (нм), а ось X отражает продолжительность периодов времени (в секундах).

На Фиг. 5D приведена сенсограмма, отражающая кинетику диссоциации при значении pH 7,4 и pH 6,0 для антитела ENL049 [G31H (легкая цепь)/ двойная замена Y27H-S57H (тяжелая цепь)], варианта экулизумаба с двойной заменой Y27H-S57H (ENG303) и экулизумаб (есу). Значения на оси Y приведены в нанометрах (нм), а ось X отражает продолжительность периодов времени (в секундах).

На Фиг. 5E приведена сенсограмма, отражающая кинетику диссоциации при значении pH 7,4 и pH 6,0 для антитела ENL058 [G31H (легкая цепь)/ двойная замена L52H-S57H (тяжелая цепь)], варианта экулизумаба L52H-S57H с двойной заменой (тяжелая цепь) и экулизумаба (есу). Значения на оси Y приведены в нанометрах (нм), а ось X отражает продолжительность периодов времени (в секундах). Антитело ENL058 не соответствует второму пороговому значению для отбора – а именно, превышено значение максимально допустимой дисперсии (для экулизумаба) для диссоциации при значении pH 7,4.

На Фиг. 6 приведена линейная диаграмма, отражающая выведение ENL000, BNJ421 и BNJ423 из сыворотки NOD/scid/C5-дефицитных мышей. Ось Y отражает процент остающегося в сыворотке антитела, а ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 7 приведена линейная диаграмма, отражающая выведение ENL000, BNJ421 и BNJ423 из сыворотки NOD/scid/C5-дефицитных мышей в присутствии или в отсутствие C5 человека. Ось Y отражает процент остающегося в сыворотке антитела, а ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 8 приведена линейная диаграмма, отражающая

активность антител ENL000, BNJ423 и BNJ421 в гемолитическом анализе *ex vivo*. Ось Y отражает процент гемолиза и ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 9А приведена линейная диаграмма, отражающая фармакокинетику антитела BNL011 у трансгенных по hFcRn мышей. Каждая линия соответствует отдельному животному. Ось Y отражает процентную концентрацию антитела в мкг/мл. Ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 9В приведена линейная диаграмма, отражающая фармакокинетику антитела BNL011 у трансгенных по hFcRn мышей. Каждая линия соответствует отдельному животному. Ось Y отражает процентную концентрацию антитела на 1-й день, остающегося в сыворотке в каждый момент времени. Ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 10А приведена линейная диаграмма, отражающая фармакокинетику антитела BNL006 у трансгенных по hFcRn мышей. Каждая линия соответствует отдельному животному. Ось Y отражает процентную концентрацию антитела в мкг/мл. Ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 10В приведена линейная диаграмма, отражающая фармакокинетику антитела BNL006 у трансгенных по hFcRn мышей. Каждая линия соответствует отдельному животному. Ось Y отражает процентную концентрацию антитела на 1-й день, остающегося в сыворотке в каждый момент времени. Ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 11А приведена линейная диаграмма, отражающая фармакокинетику антитела BNL009 у трансгенных по hFcRn мышей. Каждая линия соответствует отдельному животному. Ось Y отражает процентную концентрацию антитела в мкг/мл. Ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 11В приведена линейная диаграмма, отражающая фармакокинетику антитела BNL009 у трансгенных по hFcRn мышей. Каждая линия соответствует отдельному животному. Ось Y отражает процентную концентрацию антитела на 1-й день, остающегося в сыворотке в каждый момент времени. Ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 12 приведена линейная диаграмма, отражающая логарифмированные значения средних фармакокинетических показателей антител BHL011, BHL006 и BHL009 у трансгенных по hFcRn мышей. Каждая линия, как показано, соответствует отдельному антителу. Ось Y отражает процентную концентрацию антитела на 1-й день, остающегося в сыворотке в каждый момент времени. Ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 13 приведена линейная диаграмма, отражающая линейную зависимость средних показателей фармакокинетики антител BHL011, BHL006 и BHL009 у трансгенных по hFcRn мышей. Каждая линия, как показано, соответствует отдельному антителу. Ось Y отражает процентную концентрацию антитела на 1-й день, остающегося в сыворотке в каждый момент времени. Ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 14 приведена линейная диаграмма, отражающая блокирующую способность антитела BHL011 в гемолитическом анализе сыворотки *ex vivo* после введения одной дозы. Ось Y отражает процент гемолиза (относительно уровней до дозирования), а ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 15 приведена линейная диаграмма, отражающая блокирующую способность антитела BHL006 в гемолитическом анализе сыворотки *ex vivo* после введения одной дозы. Ось Y отражает процент гемолиза (относительно уровней до дозирования), а ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 16 приведена линейная диаграмма, отражающая блокирующую способность антитела BHL009 в гемолитическом анализе сыворотки *ex vivo* после введения одной дозы. Ось Y отражает процент гемолиза (относительно уровней до дозирования), а ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 17 приведен график, отражающий корреляцию концентрации BHL011 в сыворотке и гемолитической активности в сыворотке *ex vivo* после введения одной дозы. Ось Y отражает

процент гемолиза (относительно уровней до дозирования), а ось X отражает концентрацию антитела в мкг/мл.

На Фиг. 18 приведен график, отражающий корреляцию концентрации BNL006 в сыворотке и гемолитической активности в сыворотке *ex vivo* после введения одной дозы. Ось Y отражает процент гемолиза (относительно уровней до дозирования), а ось X отражает концентрацию антитела в мкг/мл.

На Фиг. 19 приведен график, отражающий корреляцию концентрации BNL009 в сыворотке и гемолитической активности в сыворотке *ex vivo* после введения одной дозы. Ось Y отражает процент гемолиза (относительно уровней до дозирования), а ось X отражает концентрацию антитела в мкг/мл.

На Фиг. 20 приведена линейная диаграмма, отражающая среднее гемолитической активности *ex vivo* после введения одной дозы BNL011, BNL009 или BNL006 у трансгенных по hFcRn мышей. Каждая линия, как показано, соответствует отдельному антителу. Ось Y отражает процент гемолиза (относительно уровней до дозирования), а ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 21A и 21B приведены две линейные диаграммы, отражающие полулогарифмическую (Фиг. 21A) и линейную (Фиг. 21B) зависимость аффинности BNJ441 и экулизумаба в виде функции pH. Ось Y отражает % диссоциации, а ось X отражает pH.

На Фиг. 22 приведена линейная диаграмма, отражающая фармакокинетику BNJ441 и экулизумаба у мышей NOD/scid и в отсутствие C5 человека. Ось Y отражает процентную концентрацию антитела в мкг/мл. Ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 23 приведена линейная диаграмма, отражающая фармакокинетику BNJ441 и экулизумаба у мышей NOD/scid и в присутствии C5 человека. Ось Y отражает процентную концентрацию антитела в мкг/мл. Ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 24 приведена линейная диаграмма, отражающая процент BNJ441 и экулизумаба, остающийся в сыворотке мышей NOD/scid в присутствии C5 человека, как функцию от времени. Ось

Y отражает процентную концентрацию антитела в мкг/мл. Ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 25 приведена линейная диаграмма, отражающая гемолитическую блокирующую активность антитела BNJ441 и экулизумаба в сыворотке *ex vivo* после введения одной дозы, как функцию от времени. Ось Y отражает процент гемолиза (относительно уровней до дозирования), а ось X отражает продолжительность периода времени в днях.

На Фиг. 26 приведены профили зависимости средних значений концентрации BNJ441 в сыворотке от времени после внутривенного введения дозы 200 мг или 400 мг здоровым добровольцам (верхняя панель - линейная шкала; нижняя панель - линейно-логарифмическая шкала).

На Фиг. 27 приведены профили зависимости средних уровней гемолиза эритроцитов курицы от времени после внутривенного введения плацебо, 200 мг BNJ441 или 400 мг BNJ441 здоровым добровольцам.

На Фиг. 28 отражает зависимость между концентрацией BNJ441 и процентом гемолиза эритроцитов курицы после внутривенного введения BNJ441 здоровым добровольцам-людям.

На Фиг. 29 представлено сравнение эффективности BNJ441 и экулизумаба в анализах активности терминального каскада комплемента.

На Фиг. 30 изображена структура BNJ441.

На Фиг. 31 изображены межцепочечные дисульфидные связи BNJ441.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении предложены антитела, подходящие в том числе для ингибирования терминального каскада комплемента (например, сборки и/или активности терминального каскада комплемента (ТКК) C5b-9) и опосредованное анафилатоксином C5a воспаление и, соответственно, лечения комплемент-ассоциированных расстройств. Указанные антитела отличаются рядом улучшенных характеристик по сравнению с экулизумабом, включая, например, больший период полувыведения из сыворотки у человека. Не предназначенные для какого-либо ограничения

примеры антител, конъюгатов, фармацевтических композиций и составов, а также способы применения всего вышеперечисленного подробно описаны ниже и проиллюстрированы рабочими примерами.

Антитела

Антитела против C5, описанные в настоящем документе, связываются с компонентом комплемента C5 (например, C5 человека) и ингибируют расщепление C5 на фрагменты C5a и C5b. Как описано выше, такие антитела также обладают, например, улучшенными фармакокинетическими свойствами относительно других применяемых в терапевтических целях антител против C5 (например, экулизумаба).

Согласно некоторым вариантам реализации описанное в настоящем документе антитело против C5 содержит: (i) область CDR1 тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:1, (ii) область CDR2 тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:2, (iii) область CDR3 тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:3, (iv) область CDR1 легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:4, (v) область CDR2 легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:5, и (vi) область CDR3 легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:6, где по меньшей мере одна (например, по меньшей мере две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или 10 или большее количество) аминокислота по (i)-(vi) заменена на другую аминокислоту.

Точные границы областей CDR были по-разному определены при применении различных способов. Согласно некоторым вариантам реализации положения областей CDR или каркасных областей в составе варибельного домена легкой или тяжелой цепи могут соответствовать определению из источника: Kabat et al. [(1991) «Sequences of Proteins of Immunological Interest». Публикация НИЗ № 91-3242, Департамент по вопросам здравоохранения и социальных служб США, Бетесда, Мэриленд]. В таких случаях

области CDR могут называться «областями CDR по Kabat» (например, «LCDR2 по Kabat» или «HCDR1 по Kabat»). Согласно некоторым вариантам реализации положения областей CDR вариабельной области легкой или тяжелой цепи могут соответствовать определению по Chothia et al. (1989) *Nature* 342:877-883. Соответственно, указанные области могут называться «областями CDR по Chothia» (например, «LCDR2 по Chothia» или «HCDR3 по Chothia»). Согласно некоторым вариантам реализации положения областей CDR вариабельных областей легких и тяжелых цепей могут соответствовать комбинированному определению по Kabat и Chothia. Согласно таким вариантам реализации указанные области могут называться «комбинированными областями CDR по Kabat-Chothia». В источнике Thomas et al. [(1996) *Mol Immunol* 33(17/18):1389-1401] описаны примеры идентификации границ CDR в соответствии с определениями Kabat и Chothia.

Любая аминокислота может быть заменена на любую другую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации указанная замена представляет собой консервативную замену. Консервативные замены, как правило, включают замены в следующих группах: глицин и аланин; валин, изолейцин и лейцин; аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; аспарагин, глутамин, серин и треонин; лизин, гистидин и аргинин; и фенилаланин и тирозин. Согласно некоторым вариантам реализации одна или большее количество аминокислот заменены на гистидин.

Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере одна аминокислота области CDR1 тяжелой цепи заменена на другую аминокислоту (например, заменены по меньшей мере две, три, четыре или пять аминокислот). Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере одна аминокислота области CDR2 тяжелой цепи заменена на другую аминокислоту (например, заменены по меньшей мере две, три, четыре или пять аминокислот). Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере одна аминокислота области CDR3 тяжелой цепи заменена на другую аминокислоту (например, заменены по меньшей мере две, три, четыре или пять аминокислот).

Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере

одна аминокислота области CDR1 легкой цепи заменена на другую аминокислоту (например, заменены по меньшей мере две, три, четыре или пять аминокислот). Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере одна аминокислота области CDR2 легкой цепи заменена на другую аминокислоту (например, заменены по меньшей мере две, три, четыре или пять аминокислот). Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере одна аминокислота области CDR3 легкой цепи заменена на другую аминокислоту (например, заменены по меньшей мере две, три, четыре или пять аминокислот).

Согласно некоторым вариантам реализации осуществляется замена в положении аминокислоты, выбранном из группы, состоящей из: глицина в положении 1 последовательности SEQ ID NO:1, тирозина в положении 2 последовательности SEQ ID NO:1, изолейцина в положении 3 последовательности SEQ ID NO:1, фенилаланина в положении 4 последовательности SEQ ID NO:1, серина в положении 5 последовательности SEQ ID NO:1, аспарагина в положении 6 последовательности SEQ ID NO:1, тирозина в положении 7 последовательности SEQ ID NO:1, триптофана в положении 8 последовательности SEQ ID NO:1, изолейцина в положении 9 последовательности SEQ ID NO:1, глутамина в положении 10 последовательности SEQ ID NO:1, глутаминовой кислоты в положении 1 последовательности SEQ ID NO:2, изолейцина в положении 2 последовательности SEQ ID NO:2, лейцина в положении 3 последовательности SEQ ID NO:2, пролина в положении 4 последовательности SEQ ID NO:2, глицина в положении 5 последовательности SEQ ID NO:2, серина в положении 6 последовательности SEQ ID NO:2, глицина в положении 7 последовательности SEQ ID NO:2, серина в положении 8 последовательности SEQ ID NO:2, треонина в положении 9 последовательности SEQ ID NO:2, глутаминовой кислоты в положении 10 последовательности SEQ ID NO:2, тирозина в положении 11 последовательности SEQ ID NO:2, треонина в положении 12 последовательности SEQ ID NO:2, глутаминовой кислоты в положении 13 последовательности SEQ ID NO:2, аспарагина в положении 14 последовательности SEQ ID NO:2,

фенилаланина в положении 15 последовательности SEQ ID NO:2, лизина в положении 16 последовательности SEQ ID NO:2, аспарагиновой кислоты в положении 17 последовательности SEQ ID NO:2, тирозина в положении 1 последовательности SEQ ID NO:3, фенилаланина в положении 2 последовательности SEQ ID NO:3, фенилаланина в положении 3 последовательности SEQ ID NO:3, глицина в положении 4 последовательности SEQ ID NO:3, серина в положении 5 последовательности SEQ ID NO:3, серина в положении 6 последовательности SEQ ID NO:3, пролина в положении 7 последовательности SEQ ID NO:3, аспарагина в положении 8 последовательности SEQ ID NO:3, триптофана в положении 9 последовательности SEQ ID NO:3, тирозина в положении 10 последовательности SEQ ID NO:3, фенилаланина в положении 11 последовательности SEQ ID NO:3, аспарагиновой кислоты в положении 12 последовательности SEQ ID NO:3 и валина в положении 13 последовательности SEQ ID NO:3.

Согласно некоторым вариантам реализации глицин в положении 31 последовательности SEQ ID NO:8 заменен на другую аминокислоту. Например, выделенный подчеркиванием глицин в области CDR1 легкой цепи экулизумаба может быть заменен на другую аминокислоту: GASENIYGALN (SEQ ID NO:4). Указанная замена может представлять собой замену глицина гистидином, т.е. GASENIYHALN (SEQ ID NO:17).

Согласно некоторым вариантам реализации описанное в настоящем документе антитело против C5 включает замену аминокислоты в положении аминокислоты, выбранном из группы, состоящей из: глицина в положении 26 последовательности SEQ ID NO:7, тирозина в положении 27 последовательности SEQ ID NO:7, изолейцина в положении 28 последовательности SEQ ID NO:7, фенилаланина в положении 29 последовательности SEQ ID NO:7, серина в положении 30 последовательности SEQ ID NO:7, аспарагина в положении 31 последовательности SEQ ID NO:7, тирозина в положении 32 последовательности SEQ ID NO:7, триптофана в положении 33 последовательности SEQ ID NO:7, изолейцина в положении 34 последовательности SEQ ID NO:7, глутамина в положении 35 последовательности SEQ ID NO:7,

глутаминовой кислоты в положении 50 последовательности SEQ ID NO:7, изолейцина в положении 51 последовательности SEQ ID NO:7, лейцина в положении 52 последовательности SEQ ID NO:7, пролина в положении 53 последовательности SEQ ID NO:7, глицина в положении 54 последовательности SEQ ID NO:7, серина в положении 55 последовательности SEQ ID NO:7, глицина в положении 56 последовательности SEQ ID NO:7, серина в положении 57 последовательности SEQ ID NO:7, треонина в положении 58 последовательности SEQ ID NO:7, глутаминовой кислоты в положении 59 последовательности SEQ ID NO:7, тирозина в положении 60 последовательности SEQ ID NO:7, треонина в положении 61 последовательности SEQ ID NO:7, глутаминовой кислоты в положении 62 последовательности SEQ ID NO:7, аспарагина в положении 63 последовательности SEQ ID NO:7, фенилаланина в положении 64 последовательности SEQ ID NO:7, лизина в положении 65 последовательности SEQ ID NO:7, аспарагиновой кислоты в положении 66 последовательности SEQ ID NO:7, тирозина в положении 99 последовательности SEQ ID NO:7, фенилаланина в положении 100 последовательности SEQ ID NO:7, фенилаланина в положении 101 последовательности SEQ ID NO:7, глицина в положении 102 последовательности SEQ ID NO:7, серина в положении 103 последовательности SEQ ID NO:7, серина в положении 104 последовательности SEQ ID NO:7, пролина в положении 105 последовательности SEQ ID NO:7, аспарагина в положении 106 последовательности SEQ ID NO:7, триптофана в положении 107 последовательности SEQ ID NO:7, тирозина в положении 108 последовательности SEQ ID NO:7, фенилаланина в положении 109 последовательности SEQ ID NO:7, аспарагиновой кислоты в положении 110 последовательности SEQ ID NO:7 и валина в положении 111 последовательности SEQ ID NO:7. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против C5 содержит две или большее число любых вышеперечисленных замен (например, по меньшей мере две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или 10, или большее число замен) в любой комбинации.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело

против С5 содержит по меньшей мере одну замену по сравнению с экулизумабом, отвечающую следующим критериям:

максимальная дисперсия для кинетики связывания при значении рН 7,4 с уменьшением пикового фазового сдвига на 33% через 800 секунд по сравнению с усредненным пиковым фазовым сдвигом через 800 секунд, наблюдаемым для экулизумаба;

максимальная дисперсия для кинетики диссоциации при значении рН 7,4 с уменьшением пикового фазового сдвига максимум в 3 раза за 800 секунд по сравнению с усредненным пиковым фазовым сдвигом через 800 секунд, наблюдаемым для экулизумаба;
и

минимальная дисперсия для кинетики диссоциации при значении рН 6,0 с уменьшением пикового фазового сдвига минимум в 3 раза за 800 секунд по сравнению с усредненным пиковым фазовым сдвигом через 800 секунд, наблюдаемым для экулизумаба.

Например, согласно вышеприведенному критерию (1), в том случае, если средний пиковый фазовый сдвиг через 800 секунд связывания с экулизумабом составляет приблизительно 0,75 нм, экспериментальное антитело со значением фазового сдвига, составляющим менее 0,5 нм (например, 2х или более) не удовлетворяет вышеперечисленным критериям. Напротив, антитело против С5, пиковый фазовый сдвиг для которого превышает 0,5 нм через 800 секунд, отвечает первому критерию. Благодаря таким заменам получают антитела против С5, k_a и k_d которых отличаются от экулизумаба при значении рН 7,4 в незначительной степени, однако k_d при значении рН 6,0 отличается от экулизумаба в большей степени.

Согласно некоторым вариантам реализации описанное в настоящем документе антитело против С5 содержит по меньшей мере одну замену (например, по меньшей мере две, три или четыре замены) аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: глицина в положении 31 последовательности SEQ ID NO:8, лейцина в положении 33 последовательности SEQ ID NO:8, валина в положении 91 последовательности SEQ ID NO:8 и треонина в положении 94 последовательности SEQ ID NO:8. Согласно некоторым вариантам реализации описанное в настоящем документе

антитело против C5 содержит по меньшей мере одну замену (например, две, три, четыре или пять замены) аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: тирозина в положении 27 последовательности SEQ ID NO:7, изолейцина в положении 34 последовательности SEQ ID NO:7, лейцина в положении 52 последовательности SEQ ID NO:7 и серина в положении 57 последовательности SEQ ID NO:7.

Согласно некоторым вариантам реализации описанное в настоящем документе антитело против C5 содержит в составе вариабельной области легкой цепи по меньшей мере одну замену, выбранную из следующих замен: глицина в положении 31 последовательности SEQ ID NO:8, лейцина в положении 33 последовательности SEQ ID NO:8, валина в положении 91 последовательности SEQ ID NO:8 и треонина в положении 94 последовательности SEQ ID NO:8. См. Таблицу 1 ниже. Согласно некоторым вариантам реализации описанное в настоящем документе антитело против C5 содержит в составе вариабельной области тяжелой цепи по меньшей мере одну замену, выбранную из следующих замен: тирозина в положении 27 последовательности SEQ ID NO:7, изолейцина в положении 34 последовательности SEQ ID NO:7, лейцина в положении 52 последовательности SEQ ID NO:7 и серина в положении 57 последовательности SEQ ID NO:7. См. Таблицу 1 ниже.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело содержит по меньшей мере две замены (например, по меньшей мере три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или 10 замен) аминокислот относительно группы CDR, определенной последовательностями SEQ ID NO:1-6. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации описанное в настоящем документе антитело против C5 содержит две или более замены в комбинациях и в положениях аминокислот, приведенных в Таблице 1.

Таблица 1.

Комбинации замен аминокислот

Положение аминокислоты/ АТ Комб.№:	<u>Замены в составе</u> <u>вариабельной области легкой</u> <u>цепи областей CDR</u> <u>экулизумаба</u> <u>(последовательность</u> <u>SEQ ID NO:8).</u>				<u>Замены в составе</u> <u>вариабельной области</u> <u>тяжелой цепи областей CDR</u> <u>экулизумаба</u> <u>(последовательность</u> <u>SEQ ID NO:7).</u>			
	G31	L33	V91	T94	Y27	I34	L52	S57
1	•				•			
2	•					•		
3	•						•	
4	•							•
5		•			•			
6		•				•		
7		•					•	
8		•						•
9			•		•			
10			•			•		
11			•				•	
12			•					•
13	•	•			•	•		
14	•	•			•		•	
15	•	•			•			•
16	•	•				•	•	
17	•	•				•		•
18	•	•					•	•
19	•		•		•	•		
20	•		•		•		•	
21	•		•		•			•
22	•		•			•	•	
23	•		•			•		•
24	•		•				•	•
25		•	•		•	•		
26		•	•		•		•	
27		•	•		•			•
28		•	•			•	•	

29		•	•			•		•
30		•	•				•	•
31	•	•			•			
32	•	•				•		
33	•	•					•	
34	•	•						•
35	•		•		•			
36	•		•			•		
37	•		•				•	
38	•		•					•
39		•	•		•			
40		•	•			•		
41		•	•				•	
42		•	•					•
43	•				•	•		
44		•			•	•		
45			•		•	•		
46	•				•		•	
47		•			•		•	
48			•		•		•	
49	•				•			•
50		•			•			•
51			•		•			•
52	•					•	•	
53		•				•	•	
54			•			•	•	
55	•					•		•
56		•				•		•
57			•			•		•
58	•						•	•
59		•					•	•
60			•				•	•
61	•	•	•		•			
62	•	•	•			•		
63	•	•	•				•	
64	•	•	•					•
65	•				•	•	•	•
66		•			•	•	•	•

67			•		•	•	•	•
68	•				•	•	•	
69	•				•	•		•
70	•				•		•	•
71	•					•	•	•
72				•	•	•	•	•
73				•	•	•		•
74				•	•		•	•
75				•		•	•	•
76	•	•	•		•	•	•	•

«•» обозначены замененные аминокислоты в определенном антителе. Например, АТ Комб.№76 соответствует антителу, содержащему шесть областей CDR экулизумаба, где области CDR легкой цепи содержат замены в положениях 31, 33 и 91 последовательности SEQ ID NO:8, а области CDR тяжелых цепей содержат замены в положениях 27, 34, 52 и 57 последовательности SEQ ID NO:7.

«АТ Комб.№» относится к цифровому обозначению конкретного варианта антитела против C5, упоминаемому в данной таблице.

Для ясности отметим: достаточно, чтобы варианты антител против C5, приведенные в Таблице 1, содержали последовательности аминокислот шести (6) областей CDR экулизумаба, в которых осуществляются определенные указанные замены аминокислот. Указанные варианты антител могут необязательно включать каркасные области последовательности SEQ ID NO:7 или последовательности SEQ ID NO:8.

Описанные в Таблице 1 замены могут представлять собой замены на любую аминокислоту, отличную от указанного остатка аминокислоты. Согласно некоторым вариантам реализации указанная другая аминокислота представляет собой гистидин.

Согласно некоторым вариантам реализации описанное в настоящем документе антитело против C5 содержит замену в положении аминокислоты, выбранном из группы, состоящей из: тирозина в положении 27 последовательности SEQ ID NO:7, изолейцина в положении 34 последовательности SEQ ID NO:7, лейцина в положении 52 последовательности SEQ ID NO:7 и серина

в положении 57 последовательности SEQ ID NO:7. Согласно некоторым вариантам реализации и тирозин в положении 27 последовательности SEQ ID NO:7, и лейцин в положении 52 последовательности SEQ ID NO:7 заменены на другую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации и изолейцин в положении 34 последовательности SEQ ID NO:7, и серин в положении 57 последовательности SEQ ID NO:7 заменены на другую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации и изолейцин в положении 34 последовательности SEQ ID NO:7, и лейцин в положении 52 последовательности SEQ ID NO:7 заменены на другую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации и тирозин в положении 27 последовательности SEQ ID NO:7, и серин в положении 57 последовательности SEQ ID NO:7 заменены на другую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации любых описанных в настоящем документе антител против C5 указанная другая аминокислота представляет собой гистидин. Например, и тирозин в положении 27, и серин в положении 57 могут быть заменены на гистидин.

Согласно некоторым вариантам реализации описанное в настоящем документе антитело против C5 содержит область CDR1 тяжелой цепи, содержащую последовательность или состоящую из следующей последовательности аминокислот: GHIFSNYWIQ (SEQ ID NO:23). Согласно некоторым вариантам реализации описанное в настоящем документе антитело против C5 содержит область CDR2 тяжелой цепи, содержащую или состоящую из следующей последовательности аминокислот: EILPGSGHTEYTENFKD (SEQ ID NO:19). Согласно некоторым вариантам реализации описанное в настоящем документе антитело против C5 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую следующую последовательность аминокислот:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGHIFSNYWIQWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGHTEYTENFKDRVMTTRDTSTSTVYME¹LSLRSEDTAVYYCARYFFGSSPNWYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:12).

Согласно некоторым вариантам реализации описанное в настоящем документе антитело против C5 содержит переменную область легкой цепи, содержащую следующую последовательность

аминокислот:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNWDYQQKPGKAPKLLIYGATNLTADGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNVLTPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:8).

Описанное в настоящем документе антитело против С5 может связываться с С5 при значении рН 7,4 и температуре 25°C (и, в иных случаях, в физиологических условиях) с константой диссоциации аффинной связи (K_D) составляющей по меньшей мере 0,1 (например, по меньшей мере 0,15; 0,175; 0,2; 0,25; 0,275; 0,3; 0,325; 0,35; 0,375; 0,4; 0,425; 0,45; 0,475; 0,5; 0,525; 0,55; 0,575; 0,6; 0,625; 0,65; 0,675; 0,7; 0,725; 0,75; 0,775; 0,8; 0,825; 0,85; 0,875; 0,9; 0,925; 0,95; или 0,975) нМ. Согласно некоторым вариантам реализации K_D антитела против С5 составляет не более чем 1 (например, не более чем 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, или 0,2) нМ.

Согласно некоторым вариантам реализации любого антитела против С5, описанного в настоящем документе, отношение [K_D антитела к С5 при значении рН 6,0 и С)/(K_D антитела к С5 при значении рН 7,4 и 25°C)] превышает 21 (например, превышает 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500 или 8000).

Способы определения того, связывается ли антитело с белковым антигеном и/или определения сродства (аффинности) антитела в отношении белкового антигена известны в данной области техники. Например, связывание антитела с белковым антигеном может быть детектировано и/или количественно определено с применением различных техник, таких как, не ограничиваясь перечисленными, вестерн-блоттинг, дот-блоттинг, метод поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (например, системы BIAcore; Pharmacia Biosensor AB, Уппсала, Швеция и Пискатауэй, Нью-Джерси), или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). См., например, источники: Harlow and Lane

(1988) «Antibodies: A Laboratory Manual» Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Benny K. C. Lo (2004) «Antibody Engineering: Methods and Protocols,» Humana Press (ISBN: 1588290921); Borrebaek (1992) «Antibody Engineering, A Practical Guide,» W.H. Freeman and Co., NY; Borrebaek (1995) «Antibody Engineering», 2nd Edition, Oxford University Press, NY, Oxford; Johne et al. (1993) *J Immunol Meth* 160:191-198; Jonsson et al. (1993) *Ann Biol Clin* 51:19-26; и Jonsson et al. (1991) *Biotechnics* 11:620-627. Кроме того, способы измерения аффинности (например, констант диссоциации и связывания) описаны в рабочих примерах.

В настоящем документе термин « k_a » относится к константе скорости связывания антитела с антигеном. Термин « k_d » относится к константе скорости диссоциации антитела в комплексе антитело/антиген. Термин « K_D » относится к равновесной константе диссоциации взаимодействия антитело-антиген. Указанную равновесную константу диссоциации выводят из соотношения между константами скорости реакции, $K_D = k_a/k_d$. Такие определения предпочитают проводить при 25°C или 37°C (см. рабочие примеры). Например, кинетика связывания антитела с C5 человека может быть определена при значении pH 8,0, 7,4, 7,0, 6,5 и 6,0 с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с помощью инструмента BIAcore 3000 с применением метода захвата с анти-Fc для иммобилизации антитела.

Описанное в настоящем документе антитело против C5 может обладать активностью, обуславливающей блокирование синтеза или активности активных фрагментов C5a и/или C5b белка C5 (например, белка C5 человека). За счет указанного блокирующего эффекта указанные антитела ингибируют, например, провоспалительные эффекты C5a и синтез C5b-9 мембраноатакующего комплекса (МАК) на поверхности клетки.

Способы определения того, ингибирует ли конкретное описанное в настоящем документе антитело расщепление C5, известны в данной области техники. Ингибирование компонента комплемента C5 человека способно уменьшать способность

лизировать клетки комплемента в жидкостях организма пациента. Такое уменьшение способности комплемента, присутствующего в жидкостях(ях) организма, лизировать клетки может быть измерена с применением способов, хорошо известных в данной области техники, например, с применением стандартного гемолитического анализа, такого как гемолитический анализ, описанный в источнике: Kabat and Mayer (eds.), «Experimental Immunochemistry, 2nd Edition», 135-240, Springfield, IL, CC Thomas (1961), pages 135-139, или общепринятого варианта указанного анализа, такого как метод гемолиза эритроцитов курицы, как описано, например, в источнике: Hillmen et al. (2004) *N Engl J Med* 350(6):552. Способы определения того, ингибирует ли кандидатное соединение расщепление C5 человека на формы C5a и C5b известны в данной области техники и описаны, например, в источниках: Moongkarndi et al. (1982) *Immunobiol* 162:397; Moongkarndi et al. (1983) *Immunobiol* 165:323; Isenman et al. (1980) *J Immunol* 124(1):326-31; Thomas et al. (1996) *Mol Immunol* 33(17-18):1389-401; и Evans et al. (1995) *Mol Immunol* 32(16):1183-95. Например, концентрация и/или физиологическая активность C5a и C5b в жидкости организма может быть измерена с применением способов, хорошо известных в данной области техники. Способы измерения C5a концентрация или активность включают, например, анализ хемотаксиса, РИА или ИФА ELISA (см., например, Ward and Zvaifler (1971) *J Clin Invest* 50(3):606-16 и Wurzner et al. (1991) *Complement Inflamm* 8:328-340). В случае C5b можно использовать гемолитические анализы на растворимый C5b-9, как описано в настоящем документе. Могут также применяться другие анализы, известные в данной области техники. С применением указанных или других подходящих типов анализа может проводиться скрининг кандидатных агентов, способных к ингибированию компонента комплемента C5 человека.

Для измерения концентрации белка C5 и/или продуктов его расщепления для определения способности антитела против C5 ингибировать преобразование C5 в биологически активные продукты можно применять иммунологические методики, такие как, не ограничиваясь перечисленными, ИФА ELISA. Согласно некоторым

вариантам реализации измеряют синтез C5a. Согласно некоторым вариантам реализации для детекции формирования терминального каскада комплемента используют специфические в отношении неоэпитопа C5b-9 антитела.

Гемолитические анализы можно применять для определения ингибирующей активности антитела против C5 в отношении активации комплемента. Для определения эффекта антитела против C5 на классический опосредованный каскадом комплемента гемолиз в экспериментальном растворе сыворотки *in vitro*, например, эритроцитов овцы, покрытых гемолизином, или эритроцитов курицы, сенсibilизированных антителом против эритроцитов курицы используют в качестве целевых клеток. Процент лизиса нормируют, принимая за 100% лизис, происходящий в отсутствие ингибитора. Согласно некоторым вариантам реализации классический путь комплемента активируется антителом IgM человека, например, используемым в наборе Wieslab® Classical Pathway Complement Kit (Wieslab® COMPL CP310, Euro-Diagnostica, Швеция). Вкратце, экспериментальную сыворотку инкубируют с антителом против C5 в присутствии антитела IgM человека. Количество синтезируемого C5b-9 измеряют путем приведения указанной смеси в контакт с ферментом, конъюгированным с антителом против C5b-9, и флуорогенным субстратом, и измерения поглощения на подходящей длине волны. В качестве контроля экспериментальную сыворотку инкубируют в отсутствие антитела против C5. Согласно некоторым вариантам реализации экспериментальная сыворотка представляет собой дефицитную по C5 сыворотку с добавлением полипептида C5.

Для определения эффекта антитела против C5 на опосредованный альтернативным путем гемолиз в качестве целевых клеток используют несенсibilизированные эритроциты кролика или морской свинки. Согласно некоторым вариантам реализации экспериментальный раствор сыворотки представляет собой дефицитную по C5 сыворотку с добавлением полипептида C5. Процент лизиса нормируют, принимая за 100% лизис, происходящий в отсутствие ингибитора. Согласно некоторым вариантам реализации альтернативный путь комплемента активируется липополисахаридными молекулами, например, используемыми в

наборе Wieslab® Alternative Pathway Complement Kit (Wieslab® COMPL AP330, Euro-Diagnostica, Швеция). Вкратце, экспериментальную сыворотку инкубируют с антителом против C5 в присутствии липополисахарида. Количество синтезируемого C5b-9 измеряют путем приведения указанной смеси в контакт с антителом против C5b-9, конъюгированным с ферментом, и флуорогенным субстратом, и измерения флуоресценции на подходящей длине волны. В качестве контроля экспериментальную сыворотку инкубируют в отсутствие антитела против C5.

Согласно некоторым вариантам реализации активность C5 или ингибирование указанной активности количественно определяют с применением анализа CH50eq. Анализ CH50eq представляет собой способ измерения общей активности классического пути комплемента в сыворотке. Указанный тест представляет собой анализ лизиса, в котором используются сенсibilизированные антителами эритроциты в качестве активатора классического пути комплемента и различные разведения экспериментальной сыворотки для определения количества, необходимого для обеспечения 50% лизиса (CH50). Процент гемолиза может быть определен, например, с применением спектрофотометра. Анализ CH50eq обеспечивает непрямую оценку формирования комплекса терминального каскада комплемента (ТКК), поскольку именно ТКК непосредственно отвечает за измеряемый гемолиз.

Указанный анализ хорошо известен и часто используется специалистами в данной области техники. Вкратце, для активации классического пути комплемента образцы неразведенной сыворотки (например, образцы восстановленной сыворотки человека) добавляют в лунки планшета для микроанализа, содержащие сенсibilизированные антителом эритроциты, с получением таким образом ТКК. Далее, активированные образцы сыворотки разводят в лунках планшета для микроанализа, покрытых реагентом для захвата (например, антителом, которое связывается с одним или большим количеством компонентов ТКК). ТКК, присутствующие в активированных образцах, связываются с моноклональными антителами, покрывающими поверхность лунок планшета для микроанализа. Лунки промывают и в каждую лунку добавляют

реагент для детекции, содержащий детектируемую метку и распознающий связанные ТКК. Детектируемая метка может представлять собой, например, флуоресцентную метку или ферментативную метку. Результаты анализа выражают в эквивалентных единицах CH50 на миллилитр (CH50 экв.ед./мл).

Ингибирование, например, в отношении активности терминального каскада комплемента, включает уменьшение активности терминального каскада комплемента по меньшей мере на 5% (например, по меньшей мере на 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60%), например, в гемолитическом анализе или анализе CH50eq по сравнению с эффектом контрольного антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) в аналогичных условиях и в эквимоллярной концентрации. Существенное ингибирование в настоящем документе относится к ингибированию определенной активности (например, активности терминального каскада комплемента) по меньшей мере на 40% (например, по меньшей мере 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95%, или более). Согласно некоторым вариантам реализации описанное в настоящем документе антитело против C5 содержит одну или большее количество замен аминокислот относительно областей CDR экулизумаба (т.е. последовательностей SEQ ID NO:1-6) при сохранении по меньшей мере 30% (например, по меньшей мере 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95%) ингибирующей комплемент активности в гемолитическом анализе или анализе CH50eq.

Описанное в настоящем документе антитело против C5 имеет период полувыведения из сыворотки у человека, составляющий по меньшей мере 20 (например, по меньшей мере 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36) дней. Способы измерения периода полувыведения антитела в сыворотке известны в данной области техники и проиллюстрированы в рабочих примерах. См., например, источники: Dall'Acqua et al. (2006) *J Biol Chem* 281: 23514-23524; Hinton et al. (2004) *J Biol Chem* 279:6213-6216; Hinton et al. (2006) *J Immunol* 176:346-356; и Petkova et al. (2006) *Int Immunol* 18(12):1759-69, каждый из которых

включен в настоящий документ посредством ссылки полностью. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против C5, описанное в настоящем документе, имеет период полувыведения из сыворотки, по меньшей мере на 20% (например, по меньшей мере 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400, 500%) превышающий период полувыведения из сыворотки экулизумаба, например, по оценке в одной из модельных систем на мышах, описанных в рабочих примерах (например, модельной системе на C5-дефицитных/NOD/scid мышах или трансгенных мышах hFcRn).

Модификации области Fc

Описанное в настоящем документе антитело против C5 может, согласно некоторым вариантам реализации, содержать вариант константной области Fc человека, который связывается с неонатальным Fc-рецептором человека (FcRn) с большим сродством по сравнению с природной константной областью Fc человека, из которой происходит указанный вариант константной области Fc человека. Например, константная область Fc может содержать одну или большее количество замен аминокислот (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь или более замен) относительно природной константной области Fc человека, из которой происходит указанный вариант константной области Fc человека. Указанные замены могут увеличивать сродство к связыванию антитела IgG, содержащего вариант константной области Fc, с FcRn при значении pH 6,0, с сохранением pH-зависимого характера взаимодействия. См., например, Hinton et al. (2004) *J Biol Chem* 279:6213-6216 и Datta-Mannan et al. (2007) *Drug Metab Dispos* 35:1-9. Способы тестирования того, увеличивает(ют) ли одна или большее количество замен в константной области Fc антитела сродство указанной константной области Fc к FcRn при значении pH 6,0 (с сохранением pH-зависимого характера взаимодействия) известны в данной области техники и проиллюстрированы в рабочих примерах. См., например, источники: Datta-Mannan et al. (2007) *J Biol Chem* 282(3):1709-1717; международная публикация WO 98/23289; международная публикация WO 97/34631; и патент США №6277375, содержание

каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Замены, повышающие сродство константной области Fc антитела к связыванию FcRn известны в данной области техники и включают, например, (1) тройную замену M252Y/S254T/T256E, описанную в источнике: Dall'Acqua et al. (2006) *J Biol Chem* 281: 23514-23524; (2) замены M428L или T250Q/M428L, описанные в источнике: Hinton et al. (2004) *J Biol Chem* 279:6213-6216 и Hinton et al. (2006) *J Immunol* 176:346-356; и (3) замены N434A или T307/E380A/N434A, описанные в источнике: Petkova et al. (2006) *Int Immunol* 18(12):1759-69. Дополнительные пары замен: P257I/Q311I, P257I/N434H и D376V/N434H описаны, например, в источнике: Datta-Mannan et al. (2007) *J Biol Chem* 282(3):1709-1717, содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации вариант константной области содержит замену остатка аминокислоты валина в положении 255 согласно системе EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанный вариант константной области содержит замену остатка аминокислоты аспарагина в положении 309 согласно системе EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанный вариант константной области содержит замену остатка аминокислоты изолейцина в положении 312 согласно системе EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанный вариант константной области содержит замену остатка аминокислоты в положении 386 согласно системе EU.

Согласно некоторым вариантам реализации вариант константной области Fc содержит не более чем 30 замен (например, не более чем 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, девять, восемь, семь, шесть, пять, четыре, три или две замены) аминокислот, вставок, или удалений относительно природной константной области, из которой он происходит. Согласно некоторым вариантам реализации вариант константной области Fc содержит одну или большее количество замен аминокислот, выбранных из группы, состоящей из: M252Y, S254T, T256E, N434S, M428L, V259I, T250I и V308F.

Согласно некоторым вариантам реализации вариант константной области Fc человека содержит метионин в положении 428 и аспарагин в положении 434, при этом оба положения соответствуют нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации вариант константной области Fc содержит двойную замену 428L/434S, как описано, например, в патенте США №8088376.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный вариант константной области содержит замену в положении аминокислоты 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434 или 436 (нумерация EU) относительно природной константной области Fc человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанная замена выбрана из группы, состоящей из: замены метионином глицина в положении 237; замены аланином пролина в положении 238; замены лизинном серина в положении 239; замены изолейцином лизина в положении 248; замены аланином, фенилаланином, изолейцином, метионином, глутамином, серином, валином, триптофаном или тирозином треонина в положении 250; фенилаланином, триптофаном или тирозином метионина в положении 252; замены треонином серина в положении 254; и замены глутаминовой кислотой аргинина в положении 255; аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой или глутамином треонина в положении 256; аланином, глицином, изолейцином, лейцином, метионином, аспарагином, серином, треонином или валином пролина в положении 257; замены гистидином глутаминовой кислоты в положении 258; замены аланином аспарагиновой кислоты в положении 265; фенилаланином аспарагиновой кислоты в положении 270; аланином или глутаминовой кислотой аспарагина в положении 286; замены гистидином треонина в положении 289; замены аланином аспарагина в положении 297; замены глицином серина в положении 298; замены аланином валина в положении 303; замены аланином валина в положении 305; аланином, аспарагиновой кислотой, фенилаланином, глицином, гистидином, изолейцином, лизином, лейцином, метионином, аспарагином, пролином, глутамином, аргинином,

серином, валином, триптофаном или тирозином треонина в положении 307; аланином, фенилаланином, изолейцином, лейцином, метионином, пролином, глутамином или треонином валина в положении 308; аланином, аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой, пролином или аргинином лейцина или валина в положении 309; аланином, гистидином или изолейцином глутамина в положении 311; аланином или гистидином аспарагиновой кислоты в положении 312; лизином или аргинином лейцина в положении 314; замены аланином или гистидином аспарагина в положении 315; замены аланином лизина в положении 317; замены глицином аспарагина в положении 325; замены валином изолейцина в положении 332; замены лейцином лизина в положении 334; замены гистидином лизина в положении 360; замены аланином аспарагиновой кислоты в положении 376; замены аланином глутаминовой кислоты в положении 380; замены аланином глутаминовой кислоты в положении 382; замены аланином аспарагина или серина в положении 384; аспарагиновой кислотой или гистидином глицина в положении 385; замены пролином глутамина в положении 386; и замены глутаминовой кислотой пролина в положении 387; аланином или серином аспарагина в положении 389; замены аланином серина в положении 424; аланином, аспарагиновой кислотой, фенилаланином, глицином, гистидином, изолейцином, лизином, лейцином, аспарагином, пролином, глутамином, серином, треонином, валином, триптофаном или тирозином метионина в положении 428; замены лизином гистидина в положении 433; аланином, фенилаланином, гистидином, серином, триптофаном или тирозином аспарагина в положении 434; и замены гистидином тирозина или фенилаланина в положении 436; все положения соответствуют нумерации EU.

Описанное в настоящем документе антитело против C5 может, согласно некоторым вариантам реализации, содержать полипептид тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:12 или 14, и/или полипептид легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот, приведенную в последовательности SEQ ID NO:8 или 11.

Способы получения антител против C5 и их

антигенсвязывающих фрагментов

Указанным изобретением также предусмотрены способы получения любых антител против С5 или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации способы получения антитела, описанного в настоящем документе, могут включать иммунизацию пациента (например, не являющегося человеком млекопитающего) подходящим иммуногеном. Подходящие иммуногены для получения любых из описанных в настоящем документе антител представлены в настоящем документе. Например, для получения антитела, которое связывается с С5, специалист может иммунизировать подходящего пациента (например, не являющегося человеком млекопитающее, такое как крыса, мышь, песчанка, хомяк, собака, кошка, свинья, коза, лошадь, или не являющейся человеком примат) полноразмерным полипептидом С5, таким как полноразмерный полипептид С5 человека. Согласно некоторым вариантам реализации у не являющегося человеком млекопитающего имеется дефицит, например, по С5; так, С5-дефицитные мыши описаны в источниках: Levy and Ladda (1971) *Nat New Biol* 229(2):51-52; Crocker et al. (1974) *J Clin Pathol* 27(2):122-124; Wetsel et al. (1990) *J Biol Chem* 265:2435-2440; и Jungi and Pepys (1981) *Immunology* 43(2):271-279.

Подходящий пациент (например, не являющееся человеком млекопитающее) может быть иммунизирован подходящим антигеном с последующими несколькими бустер-иммунизациями, достаточными для стимуляции синтеза антитела у указанного млекопитающего. Указанный иммуноген может вводиться пациенту (например, не являющемуся человеком млекопитающему) с адъювантом. Адъюванты, подходящие для синтеза антитела у пациента, включают, не ограничиваясь перечисленными, белковые адъюванты; бактериальные адъюванты, например, целые бактерии (БЦЖ, *Corynebacterium parvum* или *Salmonella minnesota*) и бактериальные компоненты, включая скелет клеточной стенки, димиколат трегалозы, монофосфорил-липид А, экстрагируемый метанолом остаток (MER) туберкулезной палочки, полный или неполный адъювант Фрейнда; вирусные адъюванты; химические адъюванты, например, гидроксид

алюминия, йодацетат и гемисукцинат холестерина. Другие адъюванты, подходящие для применения в способах индуцирования иммунного ответа включают, например, холерный токсин и парапоксвирусные белки. См. также Bieg et al. (1999) *Autoimmunity* 31(1):15-24. См. также: например, Lodmell et al. (2000) *Vaccine* 18:1059-1066; Johnson et al. (1999) *J Med Chem* 42:4640-4649; Balldridge et al. (1999) *Methods* 19:103-107; и Gupta et al. (1995) *Vaccine* 13(14): 1263-1276.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы включают получение гибридной линии клеток, секретирующей моноклональное антитело, которое связывается с иммуногеном. Например, полипептидом C5 иммунизируют, как описано выше, подходящее млекопитающее, такое как лабораторная мышь. Антитело-продуцирующие клетки (например, В-клетки селезенки) иммунизированного млекопитающего могут быть выделены через 2-4 дня после по меньшей мере одной бустер-иммунизации иммуногеном, и затем непродолжительно культивироваться перед слиянием с клетками подходящей миеломной клеточной линии. Слияние указанных клеток может осуществляться в присутствии стимулятора слияния, такого как, например, вирус осповакцины или полиэтиленгликоль. Гибридные клетки, полученные в результате слияния, клонируют, и отбирают секретирующие требуемые антитела клоны клеток. Например, клетки селезенки мышей Balb/c, иммунизированных подходящим иммуногеном, могут быть слиты с клетками миеломной клеточной линии RA1 или миеломной клеточной линии Sp2/0-Ag 14. После слияния клетки размножают в подходящей культуральной среде, в которую с регулярными интервалами добавляют селективную среду, например, среду с гипоксантином, аминоптеринном и тимидином (НАТ), для предотвращения преимущественного роста обычных клеток миеломы, а не требуемых клеток гибридомы. Затем проводят скрининг полученных гибридных клеток на секрецию требуемых антител, например, антитела, которое связывается с C5 и ингибирует расщепление C5 на фрагменты C5a и C5b.

Согласно некоторым вариантам реализации любые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем

документе, могут быть синтезированы в клетке CHO. Согласно некоторым вариантам реализации указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты не содержат детектируемых остатков сиаловой кислоты.

Согласно некоторым вариантам реализации специалист в данной области техники может идентифицировать антитело против C5 в неиммунной библиотеке антител, как это описано, например, в патенте США № 6300064 (Knappik et al.; Morphosys AG); и у Schoonbroodt et al. (2005) *Nucleic Acids Res* 33(9):e81.

Субпопуляция антител, скрининг которой осуществляется с применением описанных выше способов, может быть охарактеризована с точки зрения их специфичности и сродства к связыванию конкретного иммуногена (например, C5) с применением любого иммунологического или биохимического способа, известного в данной области техники. Так, сравнение специфического связывания антитела с природным полноразмерным C5 и с C5a может проводиться, например, с применением иммунологических или биохимических способов, таких как, не ограничиваясь перечисленными, ИФА ELISA, ППР-анализ, анализ иммунопреципитации, аффинная хроматография и равновесный диализ согласно как описано. Иммунологические анализы, подходящие для применения при анализе иммуноспецифического связывания и перекрестной реактивности антител включают, не ограничиваясь перечисленными, системы на основе конкурентного и неконкурентного анализа с применением таких техник, как вестерн-блоттинг, РИА, ELISA (твёрдофазный иммуноферментный анализ), иммунологические «сэндвич»-анализы, анализ иммунопреципитации, анализ иммунодиффузии, агглютинационный анализ, анализ фиксации комплемента, иммунорадиометрический анализ, иммунофлуоресцентный анализ и иммунологический анализ с белком А. Такие анализы являются рутинными и хорошо известны в данной области техники.

Анализ антител может также проводиться с применением любых анализов на основе ППР, известных в данной области техники для описания кинетических параметров взаимодействия антитела с C5. Для применения в способах, описанных в настоящем документе,

может использоваться любой коммерчески доступный инструмент для ППР включая, но не ограничиваясь перечисленными, инструменты BIAcore (Biacore AB; Уппсала, Швеция); инструменты lAsys (Affinity Sensors; Франклин, Массачусетс); систему IBIS (Windsor Scientific Limited; Беркс, Великобритания), системы ППР CELLIA (Nippon Laser and Electronics Lab; Хоккайдо, Япония) и ППР детектор Spreeta (Texas Instruments; Даллас, Техас). См., например, Mullett et al. (2000) *Methods* 22: 77-91; Dong et al. (2002) *Reviews in Mol Biotech* 82: 303-323; Fivash et al. (1998) *Curr Opin Biotechnol* 9: 97-101; и Rich et al. (2000) *Curr Opin Biotechnol* 11: 54-61.

Следует понимать, что вышеописанные способы можно также применять для определения отсутствия связывания, например, антитела против С5 с полноразмерным природным белком С3 и/или С4.

Как описано в вышеуказанных источниках после выбора фага кодирующие антитело области фага могут быть выделены и использованы для получения целых антител, в том числе антител человека, или любых требуемых фрагментов, и экспрессированы у любого требуемого хозяина, в том числе в клетках млекопитающих, клетках насекомых, растительных клетках, в дрожжах и бактериях, например, согласно подробному описанию ниже. Например, можно использовать также техники рекомбинантного получения фрагментов Fab, Fab' и F(ab')₂ с применением способов, известных в данной области техники, таких как описанные в РСТ-публикации № WO 92/22324; Mullinax et al. (1992) *BioTechniques* 12(6):864-869; и Sawai et al. (1995) *Am J Repr Immunol* 34:26-34; и Better et al. (1988) *Science* 240:1041-1043. Примеры техник, которые можно применять для получения одноцепочечных фрагментов Fv и антител включают описанные в патентах США №№ 4946778 и 5258498; в источниках: Huston et al. (1991) *Methods in Enzymology* 203:46-88; Shu et al. (1993) *Proc Nat Acad Sci USA* 90:7995-7999; и Skerra et al. (1988) *Science* 240:1038-1040.

Согласно некоторым вариантам реализации картирование эпитопов может применяться для идентификации, например, области С5, взаимодействующей с антителом. Способы идентификации

эпитопа, с которым связывается конкретное антитело, также известны в данной области техники и описаны выше.

Антитела и их фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть «гибридными» или могут быть преобразованы в «гибридные». Гибридные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты содержат участки, происходящие из двух или более разных видов (например, мыши и человека). Гибридные антитела могут быть получены из переменных областей мыши требуемой специфичности, соединенных с константными доменами человека (например, патент США №4816567). Указанным образом не принадлежащие человеку антитела могут быть модифицированы для придания большей пригодности для клинического применения у человека (например, в способах лечения или предотвращения комплемент-опосредованного расстройства у пациента).

Моноклональные антитела согласно настоящему изобретению включают «гуманизированные» формы не принадлежащих человеку антител (например, антител мыши). Гуманизированные моноклональные антитела или моноклональные антитела с привитыми CDR, в частности, подходят для применения у человека в качестве терапевтических агентов, поскольку не выводятся из кровотока настолько быстро, как антитела мыши и, как правило, не провоцируют неблагоприятную иммунную реакцию. Обычно гуманизированное антитело содержит один или большее количество введенных остатков аминокислот, происходящих не от человека. Указанные не принадлежащие человеку остатки аминокислот часто называют «импортированными» остатками, происходящими, как правило, из «импортированного» переменного домена. Способы получения гуманизированных антител в целом хорошо известны в данной области техники. Например, гуманизация может быть осуществлена по существу согласно способу Винтера (Winter) с коллегами (см., например, Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327; и Verhoeven et al. (1988) *Science* 239:1534-1536), путем замены каркасными областями грызунов или последовательностей CDR соответствующих последовательностей антитела человека. Также см., например, Staelens et al. (2006) *Mol Immunol* 43:1243-1257. Согласно

некоторым вариантам реализации гуманизированные формы не принадлежащих человеку антител (например, антител мыши) представляют собой антитела человека (реципиентное антитело), где остатки аминокислот области CDR не принадлежащего человеку антитела (например, антитела мыши, крысы, кролика или не являющегося человеком примата) с требуемой специфичностью, аффинностью и связывающей способностью прививают на основу из каркасных областей антитела человека.

В некоторых случаях один или большее количество остатков аминокислот каркасной области иммуноглобулина человека также заменены соответствующими остатками аминокислот не принадлежащего человеку антитела (так называемые «обратные мутации»). Кроме того, для изменения аминокислот в выбранных положениях в составе последовательности антитела можно применять библиотеки фагового дисплея. На свойства гуманизированного антитела также влияет выбор каркасной области человека. Кроме того, гуманизированные и химеризованные антитела могут быть модифицированы таким образом, чтобы содержать остатки, не обнаруживаемые в реципиентном антителе или донорном антителе для дополнительного улучшения характеристик антитела, таких как, например, аффинность или эффекторная функция.

Также в настоящем изобретении предложены полностью принадлежащие человеку антитела. Термин «антитело человека» включает антитела, содержащие переменные и константные области (в случае их присутствия), полученные из последовательностей иммуноглобулина человека, предпочтительно человека последовательностей зародышевой линии. Антитела человека могут включать остатки аминокислот, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, введенные с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro*, или соматической мутации *in vivo*). При этом термин «антитело человека» не включает антитела, последовательности CDR которых получены от другого вида млекопитающих, такого как мышь, привитых на каркасные последовательности человека (т.е. гуманизированные

антитела). Полностью принадлежащие человеку антитела, или антитела человека могут быть получены от трансгенных мышей, несущих гены антител человека (несущих экзоны переменных (V), (D)-сегментов, (J)-сегментов и константных (C) сегментов) или из клеток человека.

Последовательности человека могут кодировать как тяжелые, так и легкие цепи антител человека, и корректным образом функционировать у мышей, проходя реаранжировку с образованием большого репертуара антител, аналогичного репертуару человека. Трансгенные мыши могут быть иммунизированы целевым белковым иммуногеном для получения совокупности разнообразных специфических антител и кодирующих их РНК. Затем нуклеиновые кислоты из организма животного, кодирующие компоненты цепей таких антител, могут быть клонированы в вектор для дисплея. Как правило, отдельные популяции нуклеиновых кислот кодирующие последовательности тяжелых и легких цепей, клонируют, и указанные отдельные популяции затем рекомбинируют при введении в вектор таким образом, что любая копия вектора содержит случайную комбинацию из тяжелой и легкой цепи. Указанный вектор сконструирован для экспрессии цепей антител таким образом, чтобы они могли собираться и экспонироваться на внешней поверхности системы для дисплея, содержащей указанный вектор. Например, цепи антител могут экспрессироваться в виде гибридных белков с белком оболочки внешней поверхности фага. После этого могут быть отобраны системы для дисплея и проведен их скрининг на отображение связывания антител с мишенью.

Согласно некоторым вариантам реализации антитела против С5, описанные в настоящем документе, содержат измененную константную область тяжелой цепи, отличающуюся снижением (или отсутствием) эффекторной функции относительно соответствующей неизменной константной области. Эффекторные функции, действующие константную область антитела против С5, могут модулироваться посредством изменения свойств константной области или Fc-области. Изменение эффекторных функций включает, например, модуляцию одного или большего количества следующих типов активности: антителозависимая клеточная цитотоксичность

(АЗКЦ), комплементзависимая цитотоксичность (КЗЦ), апоптоз, связывание с одним или большим количеством Fc-рецепторов и провоспалительный ответ. Модуляция относится к увеличению, уменьшению или устранению эффекторной активности, проявляемой исследуемым антителом, содержащим измененную константную область, по сравнению с активностью неизменной формы константной области. Согласно конкретным вариантам реализации модуляция включает ситуации, в которых активность исчезает или полностью отсутствует.

Измененная константная область с измененным сродством к связыванию FcR и/или активностью АЗКЦ, и/или измененной активностью КЗЦ представляет собой полипептид, обладающий либо усиленной, либо ослабленной активностью в отношении связывания FcR, и/или активностью АЗКЦ и/или КЗЦ по сравнению с неизменной формой константной области. Измененная константная область, демонстрирующая усиленное связывание с FcR, связывает по меньшей мере один FcR с большим сродством по сравнению с неизменным полипептидом. Измененная константная область, демонстрирующая пониженное связывание с FcR, связывает по меньшей мере один FcR с меньшим сродством по сравнению с неизменной формой константной области. Такие варианты, демонстрирующие пониженное связывание с FcR, могут отличаться незначительным или несущественным уровнем связывания с FcR, соответствующим, например, 0-50% (например, менее чем 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1%) от уровня связывания с FcR природной последовательности константной области или Fc-области иммуноглобулина. Аналогичным образом, измененная константная область, демонстрирующая модулированную активность АЗКЦ и/или КЗЦ, может отличаться либо увеличенной, либо сниженной активностью АЗКЦ и/или КЗЦ по сравнению с неизменной константной областью. Например, согласно некоторым вариантам реализации антитело против C5, содержащее измененную константную область, может отличаться уровнем активности, соответствующим приблизительно 0-50%

(например, менее чем 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1%) от уровня активности АЗКЦ и/или КЗЦ неизменной формы константной области. Описанное в настоящем документе антитело против С5, содержащее измененную константную область, которая демонстрирует пониженную АЗКЦ и/или КЗЦ, может отличаться пониженной активностью или отсутствием активности АЗКЦ и/или КЗЦ.

Согласно определенным вариантам реализации измененная константная область содержит по меньшей мере одну замену, вставку и/или удаление аминокислоты по сравнению с природной последовательностью константной области или неизменной константной областью, например, от приблизительно 1 до приблизительно 100 замен аминокислот, вставок и/или удалений в природной последовательности константной области или константной области исходного полипептида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения измененная константная область отличается по меньшей мере приблизительно 70% гомологией (сходством) или идентичностью относительно неизменной константной области, в некоторых случаях по меньшей мере приблизительно 75%, в других случаях по меньшей мере приблизительно 80% гомологией или идентичностью, и согласно другим вариантам реализации по меньшей мере приблизительно 85%, 90% или 95% гомологией или идентичностью относительно неизменной константной области. Указанная измененная константная область может также содержать одно или большее количество удалений или вставок аминокислот. Кроме того, указанная измененная константная область может содержать одну или большее количество замен аминокислот, удалений или вставок, что приводит к изменению посттрансляционных модификаций, включая, например, измененный паттерн гликозилирования (например, добавление одного или большего количества сахарных компонентов, утрату одного или большего количества сахарных компонентов или изменение состава одного или большего количества сахарных компонентов относительно

неизменной константной области).

Антитела с измененными эффекторными функциями или не обладающие эффекторными функциями могут быть получены путем конструирования или синтеза антител, содержащих варианты константных областей, Fc-областей или областей тяжелых цепей; технология рекомбинантной ДНК и/или условия культивирования клеток и условия экспрессии можно применять для получения антител с измененной функцией и/или активностью. Например, технология рекомбинантной ДНК может применяться для введения одной или большего количества замен аминокислот, удалений или вставок в области (например, Fc-области или константные области), влияющие на функцию антитела, в том числе на эффекторные функции. Как вариант, изменения посттрансляционных модификаций, таких как, например, паттерны гликозилирования, могут обеспечиваться путем манипуляций с условиями культивирования клеток и экспрессии, с помощью которых получают указанное антитело. Подходящие способы введения одной или большего количества замен, добавлений или удалений в Fc-область антитела хорошо известны в данной области техники и включают, например, стандартные техники ДНК-мутагенеза, как описано, например, у Sambrook et al. (1989) «Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition», Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Harlow and Lane (1988), *выше*; Borrebaek (1992), *выше*; Johne et al. (1993), *выше*; в РСТ-публикации WO 06/53301; и в патенте США № 7704497.

Согласно некоторым вариантам реализации описанное в настоящем документе антитело против C5 отличается пониженной эффекторной функцией или отсутствием эффекторной функции. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против C5 содержит гибридную константную область или ее часть, например, гибридную константную область G2/G4 (см., например, Burton et al. (1992) *Adv Immun* 51:1-18; Canfield et al. (1991) *J Exp Med* 173:1483-1491; и Mueller et al. (1997) *Mol Immunol* 34(6):441-452). См. *выше*.

Помимо применения конструкции G2/G4, как описано *выше*, раскрытое в настоящем документе антитело против C5 с пониженной

эффекторной функцией может быть получено путем введения изменений других типов в последовательность аминокислот определенных областей антитела. Такие изменения последовательностей аминокислот включают, не ограничиваясь перечисленными, мутацию Ala-Ala, описанную, например, в РСТ-публикациях № WO 94/28027 и WO 98/47531; и в источнике: Xu et al. (2000) *Cell Immunol* 200:16-26. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации антитело против С5 с одной или большим количеством мутаций в составе константной области, включая мутацию Ala-Ala, отличается пониженной эффекторной функцией или отсутствием эффекторной функции. В соответствии с указанными вариантами реализации константная область антитела может содержать замену на аланин в положении 234 или мутацию с заменой на аланин в положении 235. Кроме того, измененная константная область может содержать двойную мутацию: мутацию с заменой на аланин в положении 234 и вторую мутацию с заменой на аланин в положении 235. Согласно одному варианту реализации антитело против С5 содержит каркасную область IgG4, при этом мутация Ala-Ala относится к мутации(ям) фенилаланина на аланин в положении 234 и/или мутации лейцина на аланин в положении 235. Согласно другому варианту реализации указанное антитело против С5 содержит каркасную область IgG1, при этом мутация Ala-Ala относится к мутации(ям) лейцина на аланин в положении 234 и/или мутации лейцина на аланин в положении 235. Антитело против С5 могут, в альтернативных вариантах или дополнительно, содержать другие мутации, в том числе точечную мутацию K322A в домене CH2 (Hezareh et al. (2001) *J Virol* 75:12161-12168). Антитело с указанной(ыми) мутацией(ями) в константной области может также представлять собой блокирующее или не блокирующее антитело.

Дополнительные замены, которые при введении в константную область тяжелой цепи приводят к снижению эффекторной функции, представлены, например, в источнике: Shields et al. (2001) *J Biol Chem* 276(9):6591-6604. См., в частности, Таблицу 1 («Связывание вариантов IgG1 человека с FcRn и FcγR человека) в

работе Shields и коллег, описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки полностью. С помощью скрининга на связывание с панелью рецепторов Fc (включая FcRn, FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB и FcγRIIIA) библиотеки антител против IgE, все антитела из которой отличаются друг от друга одной или большим количеством замен в константной области тяжелой цепи, авторы настоящего изобретения идентифицировали ряд замен, модулирующих специфические взаимодействия Fc с рецептором Fc. Например, вариант константной области тяжелой цепи IgG2a, где домен CH2 содержит замену D265A (нумерация аминокислот тяжелой цепи по Kabat et al. (выше)) приводит к полному устранению взаимодействия между указанным вариантом константной области и рецепторами Fc IgG FcγRIIB, FcγRIII, FcγRI и FcγRIV. Shields et al. (2001), стр. 6595, Таблица 1. См. также Baudino et al. (2008) *J Immunol* 181:6664-6669 (выше).

Изменения в составе шарнирной области также влияют на эффекторные функции. Например, удаление шарнирной области может уменьшать сродство к рецепторам Fc и ослаблять активацию комплемента (Klein et al. (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 524-528). Таким образом, настоящее изобретение также относится к антителам с изменениями в шарнирной области.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело против C5 может содержать измененную константную область, демонстрирующую усиленную или уменьшенную комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ). Модуляция активности КЗЦ может обеспечиваться путем введения одной или большего количества замен, вставок, или удалений аминокислот в Fc-области антитела. См., например, патент США № 6194551. В альтернативном варианте или дополнительно, остаток(остатки) цистеина может(могут) быть введен(ы) в Fc-область, с обеспечением таким образом образования междоцепочечной дисульфидной связи в указанной области. Гомодимерное антитело, полученное таким образом, может отличаться увеличенной или уменьшенной способностью к интернализации и/или обеспечивать увеличенный или уменьшенный комплемент-опосредованный клеточный киллинг. См., например,

Caron et al. (1992) *J Exp Med* 176:1191-1195 и Shopes (1992) *Immunol* 148:2918-2922; PCT-публикации WO 99/51642 и WO 94/29351; Duncan and Winter (1988) *Nature* 322:738-40; и патенты США № 5648260 и №5624821.

Другой потенциальный способ модулирования эффекторной функции антител включает изменения гликозилирования, обобщенные, например, в источнике: Raju (2003) *BioProcess International* 1(4):44-53. Согласно Wright и Morrison, микрогетерогенность олигосахаридов IgG человека может влиять на биологические функции, такие как КЗЦ и АЗКЦ, связывание с различными рецепторами Fc и связывание с белком Clq. (1997) *TIBTECH* 15:26-32. Паттерны гликозилирования антител могут отличаться в зависимости от продуцирующей клетки и условий культивирования клеток (Raju, выше). Такие различия могут приводить к изменениям как эффекторной функции, так и фармакокинетики. См., например, Israel et al. (1996) *Immunology* 89(4):573-578; и Newkirk et al. (1996) *Clin Exp Immunol* 106(2):259-264. Различия эффекторной функции могут быть связаны со способностью IgG связываться с рецепторами Fcγ (FcγR) на эффекторных клетках. Shields с коллегами показали, что IgG, содержащий изменения в последовательности аминокислот, улучшающие связывание с FcγR, может демонстрировать усиление АЗКЦ до 100% при применении эффекторных клеток человека. (2001) *J Biol Chem* 276(9):6591-6604. Хотя указанные изменения включают изменения аминокислот, не обнаруживаемых на связывающей поверхности, как природа сахарного компонента, так и его структурный паттерн могут также вносить вклад в наблюдаемые различия. Кроме того, присутствие или отсутствие фукозы в олигосахаридном компоненте IgG может усиливать связывание и АЗКЦ. См., например, Shields et al. (2002) *J Biol Chem* 277(30):26733-26740. IgG, в котором отсутствовал фукозилированный углевод, связанный с Asn²⁹⁷, демонстрировал нормальное связывание с рецептором FcγRI. В то же время связывание с рецептором FcγRIIIA увеличивалось 50-кратно и сопровождалось усилением АЗКЦ, в частности, при более низких

концентрациях антитела.

Существуют и другие способы изменения эффекторной функции антител. Например, антитело-продуцирующие клетки могут быть гипермутагенными, что обеспечивает синтез антител, содержащих измененные случайным образом полипептидные остатки по всей длине молекулы антитела. См., например, РСТ-публикацию WO 05/011735. Гипермутагенные клетки-хозяева включают клетки с дефектами ДНК-репарации ошибочно спаренных оснований. Антитела, полученные указанным способом, могут быть менее антигенными и/или обладать благоприятными фармакокинетическими свойствами. Кроме того, такие антитела могут отбираться на основании таких свойств, как усиленная или ослабленная эффекторная функция(функции). Дополнительное подробное описание техник молекулярной биологии, подходящих для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, приводится ниже.

Экспрессирование и очищение рекомбинантных антител

Описанные в настоящем документе антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с применением различных техник, известных в области молекулярной биологии и химии белков. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая один или оба полипептида тяжелой и легкой цепей антитела, может быть встроена в экспрессионный вектор, который содержит последовательности регуляции транскрипции и трансляции, включая, например, промоторные последовательности, сайты связывания рибосомы, последовательности старта и окончания транскрипции, последовательности старта и окончания трансляции, сигналы терминации транскрипции, сигналы полиаденилирования и энхансерные или активаторные последовательности. Регуляторные последовательности включают промотор и последовательности старта и остановки транскрипции. Кроме того, экспрессионный вектор может включать более одной системы репликации, что обеспечивает возможность его поддержания в двух разных организмах, например, в клетках млекопитающих и насекомых для экспрессирования и у прокариотического хозяина для клонирования и очищения.

Различные модификации, например, замены, могут быть введены в последовательности ДНК, кодирующие полипептиды тяжелой и/или легкой цепи, описанные в настоящем документе, с применением стандартных способов, известных специалистам в данной области техники. Например, введение гистидиновой замены в одном или нескольких положениях в области CDR антитела может осуществляться с применением стандартных способов, таких как ПЦР-опосредованный мутагенез, при котором мутированные нуклеотиды встраивают в ПЦР-праймеры таким образом, чтобы продукт ПЦР содержал требуемые мутации или обеспечивался сайт-специфический мутагенез. Замена может быть введена в одну или несколько областей CDR для повышения или понижения K_D антитела в отношении антигена, например, при значении pH 7,4 или pH 6,0. Техники сайт-специфического мутагенеза хорошо известны в данной области техники. См., например, Sambrook et al., выше.

Доступен ряд подходящих векторных систем для экспрессирования клонированных полипептидов тяжелой цепи и легкой цепи из нуклеиновых кислот в клетках млекопитающих. Использование одного класса векторов основано на интеграции нужных генных последовательностей в геном клетки-хозяина. Клетки, содержащие стабильно интегрированную ДНК, могут быть отобраны за счет одновременного введения генов лекарственной устойчивости, таких как *gpt E. coli* (Mulligan and Berg (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2072) или *neo Tn5* (Southern and Berg (1982) *Mol Appl Genet* 1:327). Указанный селектируемый маркерный ген может быть либо связан с последовательностями ДНК экспрессируемых генов, или введен в ту же клетку посредством котрансфекции (Wigler et al. (1979) *Cell* 16:77). Для векторов второго класса используют ДНК-элементы, придающие экстрахромосомной плазмиде способность к автономной репликации. Указанные векторы могут быть получены из вирусов животных, таких как бычий папилломавирус (Sarver et al. (1982) *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:7147), цитомегаловирус, полиомавирус (Deans et al. (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1292) или вирус SV40 (Lusky and Botchan (1981) *Nature* 293:79).

Экспрессионные векторы могут быть введены в клетки

подходящим для последующей экспрессии нуклеиновой кислоты способом. Способ введения в значительной мере определяется типом целевых клеток, что обсуждается ниже. Примеры способы включают осаждение с CaPO_4 , слияние с липосомами, катионные липосомы, электропорацию, вирусную инфекцию, декстран-опосредованную трансфекцию, полибрен-опосредованную трансфекцию, слияние протопластов и прямую микроинъекцию.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов включают дрожжи, бактерии, клетки насекомых, растений и млекопитающих. Особенный интерес представляют такие бактерии, как *E. coli*, такие грибы, как *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*, такие клетки насекомых, как SF9, линии клеток млекопитающих (например, линии клеток человека), а также первичные клеточные линии.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело или его фрагмент может быть экспрессирован(о) и очищен(о) из организма трансгенных животных (например, трансгенных млекопитающих). Например, антитело может быть продуцировано в организме трансгенных не являющихся человеком млекопитающих (например, грызунов) и выделено из молока, как описано, например, в источниках: Houdebine (2002) *Curr Opin Biotechnol* 13(6):625-629; van Kuik-Romeijn et al. (2000) *Transgenic Res* 9(2):155-159; и Pollock et al. (1999) *J Immunol Methods* 231(1-2):147-157.

Указанные антитела и их фрагменты могут быть получены из указанных клеток путем культивирования клетки-хозяина, трансформированной экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую указанные антитела или их фрагменты, в условиях и на протяжении периода времени, достаточных для обеспечения экспрессии белков. Такие условия экспрессирования белков варьируют в зависимости от выбора экспрессионного вектора и клетки-хозяина, и могут быть легко установлены специалистом в данной области техники с помощью рутинных экспериментов. Например, антитела, экспрессируемые *E. coli*, могут быть получены путем рефолдинга из телец включения (см., например, Hou et al. (1998) *Cytokine* 10:319-30).

Бактериальные экспрессионные системы и способы их применения хорошо известны в данной области техники (см. источники: *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley & Sons, и *Molecular Cloning--A Laboratory Manual --3rd Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)). Выбор кодонов, подходящих экспрессионных векторов и подходящих клеток-хозяев варьирует в зависимости от ряда факторов, и может быть при необходимости легко оптимизирован. Антитело (или его фрагмент) раскрытые в настоящем документе могут быть экспрессированы в клетках млекопитающих или в других экспрессионных системах, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, дрожжевых, бакуловирусных и *in vitro* экспрессионных системах (см., например, Kaszubska et al. (2000) *Protein Expression and Purification* 18:213-220).

После экспрессирования указанные антитела и их фрагменты могут быть выделены. Термин «очищенный» или «выделенный» в отношении любых описанных в настоящем документе белков (антител или их фрагментов) относится к полипептиду, который был отделен или очищен из компонентов (например, белков или других встречающихся в природе биологических или органических молекул), которые в естественных условиях сопутствуют им, например, других белков, липидов и нуклеиновой кислоты у прокариота, экспрессирующего указанные белки. Как правило, полипептид является очищенным, если он составляет по меньшей мере 60% (например, по меньшей мере 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 97 или 99%) от общей массы белка в образце.

Антитело или его фрагмент могут быть выделены или очищены различными способами, известными специалистам в данной области техники в зависимости от того, какие дополнительные компоненты присутствуют в образце. Стандартные способы очищения включают электрофоретические, молекулярные, иммунологические и хроматографические техники, в том числе ионообменную, гидрофобную, аффинную хроматографию и ВЭЖХ с обращенной фазой. Например, антитело может быть очищено с применением стандартной связывающей антитела колонки (например, колонки с белком А или белков G). Также подходят для применения техники

ультрафильтрации и диафильтрации, в сочетании с концентрацией белка. См., например, Scopes (1994) «Protein Purification, 3rd edition,» Springer-Verlag, New York City, New York. Необходимая степень очищения варьирует в зависимости от предполагаемого применения. В некоторых случаях очищение экспрессированного антитела или его фрагментов не требуется.

Способы определения выхода или чистоты очищенного антитела или его фрагмента известны в данной области техники и включают, например, анализ Бредфорда, УФ-спектроскопию, анализ белка по биуретовой реакции, анализ белка по методу Лоури, анализ белка с применением красителя амидочерного, жидкостную хроматографию высокого давления (ВЭЖХ), масс-спектрометрию (МС) и способы на основе гель-электрофореза (например, с применением окрашивания белков, такого как окрашивание кумасси синим или коллоидным серебром).

Согласно некоторым вариантам реализации из антител или их фрагментов может быть удален эндотоксин. Способы удаления эндотоксина из образца белка известны в данной области техники. Например, эндотоксин может быть удален из образца белка с применением различных коммерчески доступных реагентов, в том числе, без ограничения, наборов для удаления эндотоксинов ProteoSpin™ (Norgen Biotek Corporation), геля для удаления эндотоксинов Detoxi-Gel (Thermo Scientific; Pierce Protein Research Products), набора для удаления эндотоксинов MiraCLEAN® (Mirus) или мембраны Acrodisc™ - Mustang® E (Pall Corporation).

В данной области техники известны способы детекции и/или измерения количества эндотоксина, присутствующего в образце (как до, так и после очищения); доступны коммерческие наборы. Например, концентрация эндотоксина в образце белка может быть определена с применением хромогенного набора QCL-1000 (BioWhittaker) или наборы на основе лизата амебоцитов мечехвоста (LAL), такие как наборы Pyrotell®, Pyrotell®-T, Pyrochrome®, Chromo-LAL и CSE, поставляемые Associates of Cape Cod Incorporated.

Модификация антител или их антигенсвязывающих фрагментов

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть

модифицированы после экспрессии и очищения. Указанные модификации могут представлять собой ковалентные или нековалентные модификации. Такие модификации могут быть введены в антитела или их фрагменты, например, посредством проведения реакции целевых остатков аминокислот полипептида с органическим дериватирующим агентом, способным вступать в реакцию с выбранными боковыми цепями или концевыми остатками. Подходящие сайты для модификации могут быть выбраны с применением любых из множества критериев, включая, например, структурный анализ или анализ последовательности аминокислот антител или их фрагментов.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть конъюгированы с гетерологичным фрагментом. Указанный гетерологичный фрагмент может представлять собой, например, гетерологичный полипептид, терапевтический агент (например, токсин или лекарственное средство) или детектируемую метку, такую как, не ограничиваясь перечисленными, радиоактивная метка, ферментативная метка, флуоресцентная метка, метка с тяжелым металлом, люминесцентная метка или аффинная метка, например, биотин или стрептавидин. Подходящие гетерологичные полипептиды включают, например, антигенную метку (например, FLAG (DYKDDDDK (SEQ ID NO:20)), полигистидин (6-His; HHHHHH (SEQ ID NO:21)), гемагглютинин (ГА; YPYDVDPDYA (SEQ ID NO:22)), глутатион-S-трансферазу (GST), или связывающий мальтозу белок (MBP)) для применения при очищении указанных антител или их фрагментов. Гетерологичные полипептиды также включают полипептиды (например, ферменты), подходящие для применения в качестве диагностических или детектируемых маркеров, например, люциферазы, флуоресцентного белка (например, зеленого флуоресцентного белка (GFP)), или хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (XAT). Подходящие радиоактивные метки включают, например, ^{32}P , ^{33}P , ^{14}C , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S и ^3H . Подходящие флуоресцентные метки включают, без ограничения, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина (ФИТЦ), зеленый флуоресцентный белок (GFP), DyLight™ 488, фикоэритрин (PE), йодид пропидия (PI), PerCP, PE-Alexa Fluor® 700, Cy5,

аллофикоцианин и Cu^{7+} . Люминесцентные метки включают, например, любые из множества хелатов люминесцентных лантанидов (например, европия или тербия). Например, подходящие хелаты европия включают хелат европия с диэтилентриаминпентауксусной кислотой (DTPA) или тетраазациклодекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислотой (DOTA). Ферментные метки включают, например, щелочную фосфатазу, ХАТ, люциферазу и пероксидазу хрена.

Два белка (например, антитело и гетерологичный фрагмент) могут быть перекрестно связаны с применением любых известных химических перекрестносшивающих агентов. Примерами таких перекрестносшивающих агентов являются агенты, соединяющие два остатка аминокислот посредством связи, которая включает «защищенную» дисульфидную связь. В указанных связях дисульфидная связь в составе перекрестносшивающего элемента защищена (с помощью защитных групп на каждой стороне дисульфидной связи) от восстановления за счет действия, например, восстановленного глутатиона или фермента дисульфид-редуктазы. Один подходящий реагент, 4-сукцинимидилоксикарбонил- α -метил- α -(2-пиридилдитио)толуол (SMPT), образует такую связь между двумя белками, действуя концевой лизин на одном из белков и концевой цистеин на другом. Могут также применяться гетеробифункциональные реагенты, образующие перекрестные связи за счет разных связывающих фрагментов на каждом белке. Другие подходящие перекрестносшивающие агенты включают, без ограничения, реагенты, связывающие две аминогруппы (например, N-5-азидо-2-нитробензоилоксисукцинимид), две сульфгидрильные группы (например, 1,4-бис-малеимидобутан), аминогруппу и сульфгидрильную группу (например, сложный m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный эфир), аминогруппу и карбоксильную группу (например, 4-[п-азидосалициламидо]бутиламин), и аминогруппу и гуанидиновую группу, присутствующую в боковой цепи аргинина (например, п-азидофенилглиоксаль моногидрат).

Согласно некоторым вариантам реализации радиоактивная метка может быть непосредственно конъюгирована с аминокислотным остовом антитела. Как вариант, радиоактивная метка может быть

включена в виде части большей молекулы (например, ^{125}I в мета-[^{125}I]йодофенил-N-гидроксисукцинимид (^{125}I mIPNHS), которая связывается со свободными аминок группами с образованием мета-йодофенильных (mIP) производных соответствующих белков (см., например, Rogers et al. (1997) *J Nucl Med* 38:1221-1229) или хелата (например, с DOTA или DTPA), который в свою очередь связывается с белковым остовом. Способы конъюгации радиоактивных меток или содержащих их более крупных молекул/хелатов с антителами или антигенсвязывающими фрагментами, описанными в настоящем документе, известны в данной области техники. Такие способы включают инкубирование белков с радиоактивной меткой в условиях (например, при значениях pH, концентрации солей и/или температуре), облегчающих связывание радиоактивной метки или хелата с белком (см., например, патент США №6001329).

Способы конъюгации флуоресцентной метки (иногда называемой «флуорофором») с белком (например, антителом) известны в данной области техники химии белка. Например, флуорофоры могут быть конъюгированы со свободными аминок группами (например, лизинов) или сульфгидрильными группами (например, цистеинами) белков с применением фрагментов сложного сукцинимидилэфира (NHS) или сложного тетрафторфенилэфира (TFP), присоединенного к флуорофорам. Согласно некоторым вариантам реализации указанные флуорофоры могут быть конъюгированы с фрагментом гетеробифункционального перекрестносшивающего агента, такого как сульфо-SMCC. Подходящие способы конъюгации включают инкубирование белкового антитела или его фрагмента с флуорофором в условиях, облегчающих связывание указанного флуорофора с белком. См., например, Welch and Redvanly (2003) «Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications», John Wiley and Sons (ISBN 0471495603).

Согласно некоторым вариантам реализации указанные антитела или фрагменты могут быть модифицированы, например, фрагментом, который улучшает стабилизацию и/или удержание указанных антител в кровотоке, например, в крови, сыворотке или других тканях. Например, указанное антитело или фрагмент может быть

пегилированы, как описано, например, в источниках: Lee et al. (1999) *Bioconjug Chem* 10(6): 973-8; Kinstler et al. (2002) *Advanced Drug Deliveries Reviews* 54:477-485; и Roberts et al. (2002) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54:459-476, или модифицирован(о) гидроксиксиэтилкрахмалом (Fresenius Kabi, Германия; см., например, Pavisić et al. (2010) *Int J Pharm* 387(1-2):110-119). Стабилизирующий фрагмент может повышать стабильность или удержание антитела (или его фрагмента) по меньшей мере в 1,5 раз (например, по меньшей мере в 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 или 50 или более раз).

Согласно некоторым вариантам реализации указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть гликозилированными. Согласно некоторым вариантам реализации описанное в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может подвергаться такой ферментативной или химической обработке, или быть получен из клетки таким образом, что он(о) отличается уменьшенным гликозилированием или отсутствием гликозилирования. Способы получения менее гликозилированных антител известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 6933368; у Wright et al. (1991) *EMBO J* 10(10):2717-2723; и Co et al. (1993) *Mol Immunol* 30:1361.

Фармацевтические композиции и составы

Описанные в настоящем документе композиции могут быть представлены в виде фармацевтического раствора, например, для введения пациенту для лечения или предотвращения комплемент-ассоциированного расстройства. Указанные фармацевтические композиции обычно включают фармацевтически приемлемый носитель. В настоящем документе «фармацевтически приемлемый носитель» относится к любым физиологически совместимым и включает любые физиологически совместимые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и антимикотические агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты, и т.п. Указанные композиции могут включать фармацевтически приемлемую соль, например, соль присоединения кислоты или соль присоединения основания (см., например, Berge et al. (1977) *J Pharm Sci* 66:1-

19).

Составы с указанными композициями могут быть получены в соответствии с стандартными способами. Получение фармацевтических составов хорошо известно в данной области техники и дополнительно описано, например, в источниках: Gennaro (2000) «Remington: The Science and Practice of Pharmacy», 20th Edition, Lippincott, Williams & Wilkins (ISBN: 0683306472); Ansel et al. (1999) «Pharmaceutical Dosage Forms And Drug Система доставки», 7th Edition, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (ISBN: 0683305727); и Kibbe (2000) «Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association», 3rd Edition (ISBN: 091733096X). Согласно некоторым вариантам реализации композиция может быть введена в состав, например, забуференного раствора в подходящей концентрации и подходящего для хранения при 2–8°C (например, 4°C). Согласно некоторым вариантам реализации композиция может входить в состав для хранения при температуре ниже 0°C (например, при –20°C или –80°C). Согласно некоторым вариантам реализации указанная композиция может входить в состав для хранения на протяжении периода до 2 лет (например, на протяжении одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 1 года, 1½ лет или 2 лет) при температуре 2–8°C (например, при 4°C). Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации описанные в настоящем документе композиции стабильны при хранении на протяжении по меньшей мере 1 года при температуре 2–8°C (например, при 4°C).

Фармацевтические композиции могут быть представлены различными формами. Указанные формы включают, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, например, жидкие растворы (например, инъеклируемые и подходящие для инфузии растворы), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории. Выбор предпочтительной формы зависит, отчасти, от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Например, композиции, содержащие композицию,

предназначенную для системного или местного введения, могут быть представлены инъекруемыми и подходящими для инфузии растворами. Соответственно, указанные композиции могут быть представлены составами для парентерального введения (например, для внутривенной, подкожной, внутрибрюшинной или внутримышечной инъекции). «Парентеральное введение», «парентерально вводимые» и другие грамматически эквивалентные выражения в настоящем документе относятся к способам введения, отличным от энтерального и местного введения, как правило, посредством инъекции, и включают, без ограничения, внутривенные, интраназальные, внутриглазные, легочные, внутримышечные, внутриартериальные, интратекальные, интракапсулярные, интраорбитальные, внутрисердечные, внутрикожные, внутрилегочные, внутрибрюшинные, транстрахеальные, подкожные, субкутикулярные, внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидальные, интраспинальные, эпидуральные, внутримозговые, внутричерепные, интракаротидные и внутригрудинные инъекции и инфузии (см. ниже).

Указанные композиции могут быть представлены раствором, микроэмульсией, дисперсией, липосомами или другой упорядоченной структурой, подходящей для стабильного хранения в высокой концентрации. Стерильные инъекруемые растворы могут быть получены путем введения в подходящий растворитель композиции, описанной в настоящем документе, в нужном количестве, при необходимости, с одним из перечисленных выше ингредиентов или с комбинацией указанных ингредиентов, с последующей стерилизацией фильтрацией. Дисперсии обычно получают путем включения композиции, описанной в настоящем документе, в стерильную основу, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков способы получения стерильных инъекруемых растворов включают вакуумную и сублимационную сушку, которые дают порошок с композицией согласно настоящему документу плюс любой дополнительный требуемый ингредиент (см. ниже) из предварительно стерилизованного фильтрацией раствора. Нужная текучесть раствора может поддерживаться, например, за счет

применения покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и за счет применения поверхностно-активных веществ. Пролонгированная абсорбция инъектируемых композиций может достигаться за счет включения в композицию реагента, задерживающего абсорбцию, например, солей - моностеаратов и желатина.

Описанные в настоящем документе композиции могут также входить в состав иммунолипосомных композиций. Такие составы могут быть получены с применением известных в данной области техники способов, таких как, например, способы, описанные в источниках: Epstein et al. (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82:3688; Hwang et al. (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4030; и патенты США № 4485045 и 4544545. Липосомы с увеличенным периодом циркуляции описаны, например, в патенте США №5013556.

Согласно определенным вариантам реализации композиции могут входить в состав с носителем, защищающим указанное соединение от быстрого высвобождения, например, в состав для контролируемого высвобождения, в том числе имплантаты и системы доставки на основе микроинкапсулирования. Можно применять биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфиры и полимолочная кислота. В данной области техники известно множество способов получения таких составов. См., например, J.R. Robinson (1978) «Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems», Marcel Dekker, Inc., New York.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные композиции могут входить в состав, подходящий для внутрилегочного введения (например, для введения посредством ингалятора или небулайзера) млекопитающему, такому как человек. Способы получения составов с такими композициями хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в следующих источниках: в опубликованной заявке на патент США №20080202513; в патентах США № 7112341 и №6019968; и в публикациях РСТ №№ WO 00/061178 и WO 06/122257, содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ

посредством ссылки. Составы для ингаляторов сухого порошка и подходящие системы для введения указанных составов описаны, например, в опубликованной заявке на патент США №20070235029, публикации РСТ WO 00/69887; и в патенте США №5997848. Дополнительные составы, подходящие для внутрилегочного введения (а также способы получения составов с полипептидами), представлены, например, в опубликованных заявках на патент США №20050271660 и №20090110679.

Согласно некоторым вариантам реализации композиции могут входить в состав для доставки в глаза. В настоящем документе, термин «глаз» относится к любым анатомическим тканям и структурам, связанным с глазом. Глаз содержит стенку, состоящую из трех отдельных слоев: наружной склеры, среднего сосудистого слоя и внутренней сетчатки. Камера за хрусталиком наполнена гелеобразной текучей средой, называемой стекловидным телом. В задней части глаза располагается сетчатка, детектирующая свет. Роговица представляет собой оптически прозрачную ткань, которая передает изображения в заднюю часть глаза. Роговица включает один путь для проникновения в глаз лекарственных средств. Другие связанные с глазом анатомические тканевые структуры включают систему дренажа слезной жидкости, который включает секреторную систему, систему распределения и экскреторную систему. Секреторная система содержит секреторы, стимулируемые морганием и изменением температуры в результате испарения слезной жидкости, и рефлекторные секреторы, которые иннервированы эфферентными парасимпатическими волокнами и секретируют слезы в ответ на физическую или эмоциональную стимуляцию. Система распределения включает веки и слезный мениск по краям века открытого глаза, распределяющие слезную жидкость по поверхности глаза при моргании, уменьшая таким образом появление сухих областей.

Согласно некоторым вариантам реализации композиции могут вводиться локально, например, путем местного применения или инъекции в стекловидное тело. Например, согласно некоторым вариантам реализации указанные композиции могут входить в состав для введения в виде глазных капель.

Терапевтический состав для обработки глаза может содержать один или большее количество активных агентов в концентрации от приблизительно 0,01 до приблизительно 1% по массе, предпочтительно от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,5% в фармацевтически приемлемом растворе, суспензии или мази. Состав предпочтительно представлен в виде стерильного водного раствора, содержащего, например, дополнительные ингредиенты, такие как, не ограничиваясь перечисленными, консерванты, буферы, модифицирующие тоничность агенты, антиоксиданты и стабилизаторы, неионные смачивающие или осветляющие агенты, и увеличивающие вязкость агенты.

Подходящие консерванты для применения в таком растворе включают бензалкония хлорид, бензетония хлорид, хлорбутанол, тимеросал и т.п. Подходящие буферы включают, например, борную кислоту, бикарбонат натрия и калия, бораты натрия и калия, карбонат натрия и калия, ацетат натрия и бифосфат натрия, в количествах, достаточных для поддержания значений pH, составляющих приблизительно 6-8, предпочтительно, приблизительно 7-7,5. Подходящие модифицирующие тоничность агенты представлены декстраном 40, декстраном 70, декстрозой, глицерином, хлоридом калия, пропиленгликолем и хлоридом натрия.

Подходящие антиоксиданты и стабилизаторы включают бисульфит натрия, метабисульфит натрия, тиосульфит натрия и тиомочевину. Подходящие смачивающие и осветляющие агенты включают полисорбат 80, полисорбат 20, полуксамер 282 и тилоксапол. Подходящие увеличивающие вязкость агенты включают декстран 40, декстран 70, желатин, глицерин, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксиметилпропилцеллюлозу, ланолин, метилцеллюлозу, вазелин, полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон и карбоксиметилцеллюлозу. Указанный состав может вводиться местно в глаз нуждающегося в лечении пациента (например, пациента, страдающего ВМД) общепринятым способом, например, в форме капель, или путем омовения глаза терапевтическим раствором, содержащим одну или большее количество композиций.

Кроме того, были разработаны различные устройства для

введения лекарственных средств в полость стекловидного тела глаза. Например, в опубликованной заявке на патент США №20020026176 описан содержащий фармацевтическое средство окклюдер, который может быть введен через склеру в полость стекловидного тела для доставки фармацевтического агента в полость стекловидного тела. В другом примере в патенте США № 5443505 описано имплантируемое устройство для введения в супрахороидальное пространство или аваскулярную область для пролонгированного высвобождения лекарственного средства внутрь глаза. В патентах США №5773019 и №6001386 описано имплантируемое устройство для доставки лекарственного средства, присоединяемое к поверхности склеры глаза. Устройство содержит внутреннее ядро, содержащие эффективное количество агента с низкой растворимостью, покрытое биологически неразлагаемым полимером, проницаемым для агента с низкой растворимостью. Во время работы устройства агент с низкой растворимостью проникает через биоразлагаемую полимерную оболочку для пролонгированного высвобождения из устройства. Дополнительные способы и устройства (например, трансклеральный пластырь и доставка с помощью контактных линз) для доставки терапевтического агента в глаз описаны, например, в источниках: Ambati and Adamis (2002) *Prog Retin Eye Res* 21(2):145-151; Ranta and Urtti (2006) *Adv Drug Delivery Rev* 58(11):1164-1181; Barocas and Balachandran (2008) *Expert Opin Drug Delivery* 5(1):1-10(10); Gulsen and Chauhan (2004) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2342-2347; Kim et al. (2007) *Ophthalmic Res* 39:244-254; и PCT-публикация № WO 04/073551, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки полностью.

Как описано выше, может быть получена относительно высокая концентрация композиций. Например, указанные композиции могут входить в состав в концентрации, составляющей от приблизительно 10 мг/мл до 100 мг/мл (например, от приблизительно 9 мг/мл до 90 мг/мл; от приблизительно 9 мг/мл до 50 мг/мл; от приблизительно 10 мг/мл до 50 мг/мл; от приблизительно 15 мг/мл до 50 мг/мл; от приблизительно 15 мг/мл до 110 мг/мл; от приблизительно 15 мг/мл до 100 мг/мл; от приблизительно 20

мг/мл до 100 мг/мл; от приблизительно 20 мг/мл до 80 мг/мл; от приблизительно 25 мг/мл до 100 мг/мл; от приблизительно 25 мг/мл до 85 мг/мл; от приблизительно 20 мг/мл до 50 мг/мл; от приблизительно 25 мг/мл до 50 мг/мл; от приблизительно 30 мг/мл до 100 мг/мл; от приблизительно 30 мг/мл до 50 мг/мл; от приблизительно 40 мг/мл до 100 мг/мл; или от приблизительно 50 мг/мл до 100 мг/мл). Согласно некоторым вариантам реализации композиции могут входить в состав в концентрации, превышающей 5 мг/мл и составляющей менее чем 50 мг/мл. Способы получения водных растворов белков известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США №7390786; McNally and Hastedt (2007), "Protein Formulation and Delivery," Second Edition, *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, Volume 175, CRC Press; и Banga (2005), "Therapeutic peptides and proteins: formulation, processing, and delivery systems, Second Edition" CRC Press. Согласно некоторым вариантам реализации указанный водный раствор отличается нейтральным значением pH, например, значением pH от 6,5 до 8 (например, от 7 до 8 включительно). Согласно некоторым вариантам реализации водный раствор отличается значением pH, составляющим приблизительно 6,6; 6,7; 6,8; 6,9; 7; 7,1; 7,2; 7,3; 7,4; 7,5; 7,6; 7,7; 7,8; 7,9; или 8,0. Согласно некоторым вариантам реализации значение pH водного раствора превышает (или равно) 6 (например, составляет или более 6,1; 6,2; 6,3; 6,4; 6,5; 6,6; 6,7; 6,8; 6,9; 7; 7,1; 7,2; 7,3; 7,4; 7,5; 7,6; 7,7; 7,8; или 7,9), или составляет менее чем pH8.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие терапевтический полипептид, могут быть включены в генной конструкции для применения в качестве части протокола генной терапии для доставки нуклеиновых кислот, которые можно применять для экспрессии и синтеза агентов в клетках. Экспрессионные конструкции с такими компонентами могут вводиться в любом терапевтически эффективном носителе, например, в любом составе или композиции, способной обеспечивать эффективную доставку гена компонента в клетки *in vivo*. Способы включают введение целевого гена в вирусные векторы, в том числе рекомбинантные

ретровирусные, аденовирусные, аденоассоциированные вирусные, лентивирусные векторы и векторы на основе вируса простого герпеса 1 (HSV-1), или рекомбинантные бактериальные или эукариотические плазмиды. Вирусные векторы могут непосредственно трансфицировать клетки; плазмидная ДНК может вводиться с применением, например, катионных липосом (липофектина) или дериватизированных конъюгатов полилизина, грамицидина S, искусственных вирусных оболочек или других таких внутриклеточных носителей, а также прямой инъекции указанной генной конструкции или осаждения CaPO_4 (см., например, WO04/060407), выполняемого *in vivo*. (См. также: «Способы применения *ex vivo*», ниже). Примеры подходящих ретровирусов включают pLJ, pZIP, pWE и pEM, которые известны специалистам в данной области техники (см., например, Eglitis et al. (1985) *Science* 230:1395-1398; Danos and Mulligan (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6460-6464; Wilson et al. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3014-3018; Armentano et al. (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6141-6145; Huber et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8039-8043; Ferry et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8377-8381; Chowdhury et al. (1991) *Science* 254:1802-1805; van Beusechem et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7640-7644; Kay et al. (1992) *Human Gene Therapy* 3:641-647; Dai et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10892-10895; Hwu et al. (1993) *J Immunol* 150:4104-4115; патенты США №№ 4868116 и 4980286; и публикации PCT №№ WO89/07136, WO89/02468, WO89/05345 и WO92/07573). Другая система доставки на основе вирусных генов задействует полученные из аденовирусов векторы (см., например, Berkner et al. (1988) *Biotechnics* 6:616; Rosenfeld et al. (1991) *Science* 252:431-434; и Rosenfeld et al. (1992) *Cell* 68:143-155). Подходящие аденовирусные векторы получают из штамма аденовируса Ad 5 типа dl324 или других штаммов аденовируса (например, Ad2, Ad3, Ad7 и т.п.) известны специалистам в данной области техники. Еще одна вирусная векторная система, подходящая для доставки целевого гена, представлена аденоассоциированным вирусом (AAV). См., например, Flotte et al. (1992) *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:349-356;

Samulski et al. (1989) *J Virol* 63:3822-3828; и McLaughlin et al. (1989) *J Virol* 62:1963-1973.

Согласно некоторым вариантам реализации композиции могут входить в состав с одним или большим числом дополнительных терапевтических агентов, например, дополнительных терапевтических средств для лечения или предотвращения комплемент-ассоциированного расстройства (например, АП-ассоциированного расстройства или КП-ассоциированного расстройства) у пациента. Дополнительные агенты для лечения комплемент-ассоциированного расстройства у пациента варьируют в зависимости от конкретного расстройства, лечение которого проводится, однако могут включать, без ограничения, антигипертензивный агент (например, ингибитор ангиотензинпревращающего фермента) [для применения при лечении, например, HELLP-синдрома], антикоагулянт, кортикостероид (например, преднизон) или иммуносупрессорный агент (например, винкристин или циклоспорин А). Примеры антикоагулянтов включают, например, варфарин (кумадин), аспирин, гепарин, фениндион, фондапаринукс, идрапаринукс и ингибиторы тромбина (например, аргатробан, лепирудин, бивалирудин или дабигатран). Описанная в настоящем документе композиция может также входить в состав с фибринолитическим агентом (например, анкродом, ϵ -аминокапроновой кислотой, антиплазмином- α_1 , простациклином и дефибротидом) для лечения комплемент-ассоциированного расстройства. Согласно некоторым вариантам реализации композиция может входить в состав с гиполипидемическим агентом, таким как ингибитор гидроксиметилглутарил-CoA-редуктазы. Согласно некоторым вариантам реализации композиция может входить в состав с направленным против CD20 агентом, или в состав для применения с направленным против CD20 агентом, таким как ритуксимаб (Ритуксан[™]; Biogen Idec, Кембридж, Массачусетс). Согласно некоторым вариантам реализации, например, для лечения РА, композиция может входить в состав с инфликсимабом (Ремикейд[®]; Centocor, Inc.) и/или метотрексатом (Реуматрекс[®], Трексалл[®]). Согласно некоторым вариантам реализации описанная в

настоящем документе композиция может входить в состав с нестероидным противовоспалительным препаратом (НПВП). Доступно множество НПВП, некоторые из которых являются безрецептурными, включая ибупрофен (Адвил®, Мотрин®, Нуприн®) и напроксен (Алив®); многие другие продаются при наличии рецепта, включая мелоксикам (Мобик®), этодолак (Лодин®), набуметон (Релафен®), сулиндак (Клинорил®), толементин (Толектин®), холинсалицилат магния (Трилазат®), диклофенак (Катафлам®, Вольтарен®, Артротек®), дифлунизал (Долобид®), индометацин (Индоцин®), кетопрофен (Орудис®, Орувайл®), оксапрозин (Дейпро®) и пироксикам (Фелден®). Согласно некоторым вариантам реализации композиция может входить в состав для применения с антигипертензивным, противосудорожным агентом (например, сульфатом магния) или антитромботическим агентом. Антигипертензивные средства включают, например, лабеталол, гидралазин, нифедипин, антагонисты кальциевых каналов, нитроглицерин, или нитропруссид натрия. (См., например, Mihi et al. (2007) *J Gastrointest Liver Dis* 16(4):419-424.) Антитромботические агенты включают, например, гепарин, антитромбин, простациклин или низкодозовый аспирин.

Согласно некоторым вариантам реализации композиции, представленные составами для внутрилегочного введения могут включать по меньшей мере один дополнительный активный агент для лечения расстройства легких. Указанный по меньшей мере один активный агент может представлять собой, например, антитело против IgE (например, омализумаб), антитело против ИЛ-4 или антитело против ИЛ-5, ингибитор IgE (например, монтелукаст натрия), симпатомиметик (например, альбутерол), антибиотик (например, тобрамицин), дезоксирибонуклеаза (например, Пульмозим®), антихолинэргическое лекарственное средство (например, бромид ипратропия), кортикостероид (например, дексаметазон), агонист β -адренорецептора, ингибитор лейкотриена (например, зилейтон), ингибитор 5-липоксигеназы, ингибитор ФДЭ, антагонист CD23, антагонист ИЛ-13, ингибитор высвобождения цитокинов, антагонист гистаминового H1-рецептора,

антигистаминный, противовоспалительный агент (например, кромолин натрия) или ингибитор высвобождения гистаминов.

Согласно некоторым вариантам реализации композиции могут входить в состав для введения с одним или большим количеством дополнительных терапевтических агентов для применения при лечении комплемент-ассоциированного расстройства глаз. Такие дополнительные терапевтические агенты могут представлять собой, например, бевацизумаб или Fab-фрагмент бевацизумаба или ранибизумаба, продаваемые Roche Pharmaceuticals, Inc., и пегаптаниб натрия (Мукоген®; Pfizer, Inc.). Такой набор может также, необязательно, включать инструкции для введения указанной композиции пациенту.

Согласно некоторым вариантам реализации композиции могут входить в состав для введения пациенту в сочетании с внутривенной терапией гаммаглобулином (IVIG), плазмафорезом, замещением плазмы или плазмообменом. Согласно некоторым вариантам реализации композиции могут входить в состав для применения до, во время или после трансплантации почки.

В том случае, если композиции предназначены для применения в комбинации с вторым активным агентом, указанные композиции могут входить в один состав с вторым агентом, либо указанные композиции и второй агент могут входить в отдельные составы. Так, соответствующие фармацевтические композиции могут быть смешаны, например, непосредственно перед введением, и введены совместно или по отдельности, например, одновременно или в разное время (см. ниже).

Применение

Описанные в настоящем документе композиции можно применять для ряда вариантов диагностического и терапевтического применения. Например, меченые детектируемыми метками антигенсвязывающие молекулы можно применять в анализах для детекции присутствия или количества целевых антигенов в образце (например, биологическом образце). Указанные композиции можно применять в анализах *in vitro* для исследования ингибирования функции целевого антигена. Согласно некоторым вариантам реализации, например, отличающихся тем, что композиции

связывают и ингибируют белок комплемента, указанные композиции можно применять в качестве положительного контроля в анализах, разработанных для идентификации дополнительных новых соединений, которые ингибируют активность комплемента или по иной причине подходят для лечения комплемент-ассоциированного расстройства. Например, ингибирующая C5 композиция может применяться в качестве положительного контроля в анализе для идентификации дополнительных соединений (например, малых молекул, аптамеров или антител), которые уменьшают или устраняют синтез C5 или образование МАК. Указанные композиции могут также применяться в терапевтических способах согласно подробному описанию ниже.

Способы лечения

Описанные в настоящем документе композиции могут вводиться пациенту, например, пациенту-человеку, с применением различных способов, отчасти зависящих от способа введения. Указанный способ может представлять собой, например, внутривенную инъекцию или инфузию (в/в), подкожную инъекцию (п/к), внутривенную (в/б) инъекцию или внутримышечную инъекцию (в/м).

Подкожное введение может осуществляться с помощью устройства. Указанное устройство может представлять собой шприц, предварительно заполненный шприц, одноразовый или многоразовый автоинжектор, шприц-ручку, накладной инжектор, носимый инжектор, амбулаторный шприцевой инфузионный насос с системой для подкожной инфузии, или другое устройство для сочетания с лекарственным антителом для подкожной инъекции.

Введение можно осуществлять, например, посредством местной инфузии, инъекции или с применением имплантата. Имплантат может быть представлен пористым, непористым или телеобразным материалом, в том числе мембраной, например, силикатной мембраной или волокном. Имплантат может быть выполнен с возможностью обеспечения пролонгированного или периодического высвобождения композиции в организме пациента. См., например, опубликованную заявку на патент США № 20080241223; патенты США № 5501856; №4863457; и №3710795; EP488401; и EP 430539,

содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Описанная в настоящем документе композиция может быть доставлена указанному пациенту с помощью имплантируемого устройства на основе, например, диффузионных, разлагаемых или конвективных систем, например, осмотических насосов, биоразлагаемых имплантатов, электродиффузионных систем, электроосмотических систем, паровых насосов, электролитических насосов, насосов на основе газовыделения, пьезоэлектрических насосов, эрозионных систем или электромеханических систем.

Согласно некоторым вариантам реализации терапевтическую доставку описанной в настоящем документе композиции пациенту осуществляют путем местного введения. В настоящем документе «местное введение» или «местная доставка» относится к доставке, не основанной на транспорте указанной композиции или агента к предполагаемой целевой ткани или сайту через сосудистую систему. Например, композиция может быть доставлена посредством инъекции или имплантации указанной композиции или агента или посредством инъекции или имплантации устройства, содержащего указанную композицию или агент. После местного введения поблизости от целевой ткани или участка указанная композиция или агент, или один или большее количество ее(его) компонентов, могут диффундировать в предполагаемую целевую ткань или участок.

Согласно некоторым вариантам реализации описанная в настоящем документе композиция может быть локально введена в сустав (например, шарнирный сустав). Например, согласно вариантам реализации в тех случаях, когда расстройство представляет собой артрит, подходящая для терапевтического применения композиция может вводиться непосредственно в сустав (например, в суставную щель) или поблизости от сустава. Примеры внутрисуставных соединений, в которые может местно вводиться описанная в настоящем документе композиция, включают, например, бедренный сустав, коленный, локтевой, лучезапястный сустав, ключично-грудинный, височно-нижнечелюстной, запястный, предплюсневой, голеностопный сустав и любой другой сустав,

подверженный артритическим состояниям. Описанная в настоящем документе композиция может также вводиться в синовиальную сумку, например, акромиальную, двуглаво-лучевую, лучезапястную, дельтовидную, поднадколенную, седалищную и любую другую сумку, известную в медицине.

Согласно некоторым вариантам реализации описанная в настоящем документе композиция может быть локально введена в глаз. В настоящем документе термин «глаз» относится к любым связанным с глазом анатомическим тканям и структурам. Глаз содержит стенку, состоящую из трех отдельных слоев: наружной склеры, среднего сосудистого слоя и внутренней сетчатки. Камера за хрусталиком наполнена гелеобразной текучей средой, называемой стекловидным телом. В задней части глаза располагается сетчатка, детектирующая свет. Роговица представляет собой оптически прозрачную ткань, которая передает изображения в заднюю часть глаза. Роговица включает один путь для проникновения в глаз лекарственных средств. Другие связанные с глазом анатомические тканевые структуры включают систему дренажа слезной жидкости, который включает секреторную систему, систему распределения и экскреторную систему. Секреторная система содержит секреторы, стимулируемые морганием и изменением температуры в результате испарения слезной жидкости, и рефлекторные секреторы иннервированные эфферентными парасимпатическими волокнами и секреторируют слезы в ответ на физическую или эмоциональную стимуляцию. Система распределения включает веки и слезный мениск по краям века открытого глаза, распределяющие слезную жидкость по поверхности глаза при моргании, уменьшая таким образом появление сухих областей.

Согласно некоторым вариантам реализации описанную в настоящем документе композицию вводят в заднюю камеру глаза. Согласно некоторым вариантам реализации описанную в настоящем документе композицию вводят в стекловидное тело. Согласно некоторым вариантам реализации описанная в настоящем документе композицию вводят трансклерально.

Согласно некоторым вариантам реализации, например, согласно вариантам лечения или предотвращения расстройства,

такого как ХОБЛ или астма, описанная в настоящем документе композиция может вводиться пациенту через легкие. Доставка лекарственного средства через легкие может обеспечиваться посредством ингаляции; в настоящем документе введение посредством ингаляции может осуществляться перорально и/или назально. Примеры фармацевтических устройств для доставки через легкие включают ингаляторы для введения отмеренных доз, ингаляторы сухого порошка (DPI) и небулайзеры. Например, описанная в настоящем документе композиция может вводиться в легкие пациента с помощью ингалятора сухого порошка. Указанные ингаляторы представляют собой не содержащие пропеллентов устройства для доставки диспергируемых стабильных сухих порошковых составов в легкие. Ингаляторы сухого порошка хорошо известны в области медицины и включают, без ограничения: TurboHaler® (AstraZeneca; Лондон, Англия), ингалятор AIR® (Alkermes®; Кембридж, Массачусетс); Rotahaler® (GlaxoSmithKline; Лондон, Англия); и Eclipse™ (Sanofi-Aventis; Париж, Франция). См. также: например, публикации РСТ WO 04/026380, WO 04/024156 и WO 01/78693. Ингаляторы DPI использовались для введения в легкие таких полипептидов, как инсулин и гормон роста. Согласно некоторым вариантам реализации описанная в настоящем документе композиция может вводиться в легкие с помощью ингалятора для введения отмеренных доз. В указанных ингаляторах используется пропеллент для доставки отдельной дозы соединения в легкие. Примеры соединений для введения при помощи ингаляторов отмеренных доз включают, например, Astovent® (Boehringer-Ingelheim; Риджфилд, Коннектикут) и Flovent® (GlaxoSmithKline). См. также: например, патенты США №6170717; №5447150; и №6095141.

Согласно некоторым вариантам реализации описанная в настоящем документе композиция может вводиться в легкие пациента с помощью небулайзера. В небулайзерах используется сжатый воздух для доставки соединения в виде сжиженного аэрозоля или «миста». Небулайзер может представлять собой, например, струйный небулайзер (например, воздушный или жидкостный струйный небулайзер) или ультразвуковой небулайзер.

Дополнительные устройства и способы внутрилегочного введения описаны, например, в опубликованных заявках на патент США №20050271660 и №20090110679, содержание каждой из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации предложенные в настоящем изобретении композиции входят в состав единичной лекарственной формы, которая, в частности, может подходить для самостоятельного введения. Готовый продукт согласно настоящему изобретению может быть размещен в контейнере, как правило, например, во флаконе, картридже, заполненном шприце или одноразовом шприце-ручке. Может также применяться дозатор, такой как дозирующее устройство, описанное в патенте США №6302855, например, в сочетании с инъекционной системой согласно настоящему изобретению.

В инъекционной системе согласно настоящему изобретению может использоваться шприц-ручка для доставки, как описано в патенте США №5308341. Шприцы-ручки, чаще всего используемые пациентами с диабетом для самостоятельного введения инсулина, хорошо известны в данной области техники. Такие устройства могут содержать по меньшей мере одну инъекционную иглу (например, иглу 31 размера, длиной приблизительно 5–8 мм), как правило, предварительно заполнены одной или большим количеством терапевтических разовых доз терапевтического раствора и подходят для быстрой доставки указанного раствора пациенту с минимальной возможной болезненностью.

Один вариант ручки для введения медикамента включает держатель флакона, в который может быть помещен флакон с инсулином или другим медикаментом. Держатель флакона представляет собой удлиненную, как правило, цилиндрическую структуру с проксимальным и дистальным концами. Дистальный конец держателя флакона включает приспособление для соединения для закрепления канюли двусторонней иглы. Проксимальный конец также включает приспособление для соединения для закрепления корпуса ручки, которая содержит приводной механизм и дозирующее устройство. Содержащие медикамент (например, высококонцентрированный раствор описанной в настоящем документе

композиции) одноразовый флакон для применения с известным из уровня техники держателем флакона включает дистальный конец с прокалываемой эластомерной перегородкой, через которую может проходить один конец канюли двусторонней иглы. На проксимальном конце указанного флакона находится стоппер, подвижно соединенный непроницаемым для жидкостей образом с цилиндрической стенкой флакона. Ручку для введения медикамента используют, вставляя флакон с медикаментом в держатель флакона. Затем корпус ручки соединяют с проксимальным концом держателя флакона. В корпусе ручки находится устройство для дозированной подачи заданной дозы медикамента для доставки с помощью ручки, и приводное устройство, обеспечивающее движение стоппера флакона в дистальном направлении на расстояние, соответствующее выбранной дозе. Пользователь шприца-ручки присоединяет канюлю двусторонней иглы к дистальному концу держателя флакона таким образом, что проксимальный участок канюли иглы прокалывает пробку на флаконе. Затем пациент выбирает дозу и использует шприц для продвижения стоппера в дистальном направлении для доставки выбранной дозы. Устройство для выбора дозы возвращается в нулевое положение после инъекции выбранной дозы. Затем пациент извлекает и утилизирует канюлю иглы, и сохраняет ручку для введения медикамента в подходящем месте до следующего необходимого введения медикамента. Медикамент во флаконе заканчивается после нескольких таких введений медикамента. Затем пациент отделяет держатель флакона от корпуса ручки. После этого пустой флакон может быть извлечен и утилизирован. В держатель флакона может быть вставлен новый флакон, и держатель флакона и корпус ручки могут быть повторно собраны и использованы, как описано выше. Соответственно, ручка для введения медикамента обычно содержит приводной механизм для точного дозирования и простоты применения.

Механизм дозирования, такой как поворотная кнопка, позволяет пользователю точно отмерить количество медикамента для инъекции при помощи шприца-ручки из флакона с расфасованным медикаментом. Для инъектирования дозы медикамента пользователь вводит иглу под кожу и однократно нажимает на кнопку до упора.

Ручка может представлять собой полностью механическое устройство или может содержать электронную схему для точного дозирования и/или измерения дозы медикамента, вводимой пользователю. См., например, патент США №6192891.

Согласно некоторым вариантам реализации игла шприца-ручки является одноразовой, и указанные наборы включают одну или большее количество одноразовых сменных игл. Шприцы-ручки, подходящие для доставки любой из представленных в настоящем описании композиций также описаны, например, в патентах США №6277099; №6200296; и №6146361, содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Шприц-ручка на основе микроиглы описан, например, в патенте США №7556615, полностью включенном в настоящий документ посредством ссылки. См. также шприц-ручку Precision Pen Injector (PPI), Molly™, выпускаемое Scandinavian Health Ltd.

В настоящем изобретении также предложены составы с контролируемым высвобождением или с продленным высвобождением, подходящие для длительного и/или самостоятельного введения медикамента, такого как описанная в настоящем документе композиция. Различные составы могут вводиться нуждающемуся в лечении указанным медикаментом пациенту в виде болюса или путем непрерывной инфузии на протяжении периода времени.

Согласно некоторым вариантам реализации реализации высококонцентрированную композицию, описанную в настоящем документе, вводят в состав для пролонгированного высвобождения, продленного высвобождения, отложенного высвобождения, контролируемого высвобождения или непрерывного высвобождения. Согласно некоторым вариантам реализации используют депо-составы для введения указанной композиции нуждающемуся в этом пациенту. Согласно указанному способу композиция входит в состав с одним или большим количеством носителей, обеспечивающих постепенное высвобождение активного агента на протяжении периода, составляющего несколько часов или дней. В таких составах часто используется разлагаемая матрица, постепенно рассеивается в организме, высвобождая активный агент.

Согласно некоторым вариантам реализации описанную в

настоящем документе композицию вводят нуждающемуся в этом пациенту внутривенно. Например, описанная в настоящем документе композиция может быть доставлена с помощью небулайзера или ингалятора пациенту (например, человеку), пораженному таким расстройством, как астма или ХОБЛ.

Подходящая доза описанной в настоящем документе композиции, обеспечивающая лечение или предотвращение расстройства у пациента, может зависеть от различных факторов, включая, например, возраст, пол и массу подлежащего лечению пациента и конкретного используемого ингибирующего соединения. Например, для лечения пациента, страдающего РА, может требоваться доза одной композиции (например, направленной против С5 композиции), отличная от дозы другой композиции (например, направленной против ФНО α композиции), необходимой для лечения того же пациента. Другие факторы, влияющие на дозу для введения пациенту, включают, например, тип или тяжесть расстройства. Например, пациенту, страдающему РА, может потребоваться введение дозы описанной в настоящем документе направленной против С5 композиции, отличной от дозы для пациента, страдающего ПНГ. Другие факторы могут включать, например, другие медицинские расстройства, которыми пациент страдает одновременно или страдал ранее, общее состояние здоровья пациента, генетическая предрасположенность пациента, рацион питания, время введения, скорость выделения, комбинация лекарственных средств, и любые другие дополнительные терапевтические средства, которые вводятся указанному пациенту. Следует также понимать, что специфическая дозировка и схема лечения для какого-либо конкретного пациента зависит также от мнения практикующего медицинского специалиста (например, врача или медицинской сестры).

Описанная в настоящем документе композиция может вводиться в фиксированной дозе, или в дозе в миллиграммах на килограмм массы тела (мг/кг). Согласно некоторым вариантам реализации доза может также выбираться таким образом, чтобы уменьшать или предотвращать синтез антител или других иммунных реакций

хозяина против одной или большего числа антигенсвязывающих молекул в композиции. Ниоим образом не предназначенные для ограничения примеры дозировок антитела, такого как в описанной в настоящем документе композиции, включают, например, 1-1000 мг/кг, 1-100 мг/кг, 0,5-50 мг/кг, 0,1-100 мг/кг, 0,5-25 мг/кг, 1-20 мг/кг и 1-10 мг/кг. Примеры дозировок описанной в настоящем документе композиции включают, без ограничения, 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4 мг/кг, 8 мг/кг или 20 мг/кг.

Фармацевтический раствор может включать терапевтически эффективное количество описанной в настоящем документе композиции. Такие эффективные количества могут быть легко определены специалистом в данной области техники, отчасти на основании эффекта введенной композиции, или комбинированного эффекта композиции и одного или большего количества дополнительных активных агентов, в том случае, если используется более чем один агент. Терапевтически эффективное количество описанной в настоящем документе композиции может также варьировать в зависимости от таких факторов, как статус заболевания, возраст, пол и масса тела индивидуума, и способность указанной композиции (и одного или большего количества дополнительных активных агентов) вызывать требуемый ответ у индивидуума, например, облегчение по меньшей мере одного показателя состояния, например, облегчение по меньшей мере одного симптом комплемент-опосредованного расстройства. Например, терапевтически эффективное количество описанной в настоящем документе композиции способно ингибировать (уменьшать тяжесть или предотвращать возникновение) и/или предотвращать конкретное расстройство, и/или любой из симптомов конкретного расстройства, известных в данной области техники или описанных в настоящем документе. Терапевтически эффективным количеством также является количество, при применении которого терапевтически благоприятные эффекты превышают какие-либо токсические или пагубные эффекты композиции.

Подходящие для человека дозы любых из описанных в настоящем документе композиций могут также оцениваться в ходе,

например, исследований фазы I с эскалацией доз. См., например, van Gurp et al. (2008) *Am J Transplantation* 8(8):1711-1718; Hanouska et al. (2007) *Clin Cancer Res* 13(2, part 1):523-531; и Hetherington et al. (2006) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(10): 3499-3500.

Термины «терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза», или аналогичные термины в настоящем документе означают среднее количество агента (например, описанной в настоящем документе композиции), вызывающее требуемый биологический или медицинский ответ (например, улучшение одного или большего числа симптомов комплемент-ассоциированного расстройства). Согласно некоторым вариантам реализации описанный в настоящем документе фармацевтический раствор содержит терапевтически эффективное количество по меньшей мере одной из указанных композиций. Согласно некоторым вариантам реализации указанные растворы содержат одну или большее количество композиций и один или большее количество (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, 10, или 11 или более) дополнительных терапевтических агентов, так что указанная композиция в целом является терапевтически эффективной. Например, раствор может содержать направленную против C5 композицию, описанную в настоящем документе, и иммуносупрессорный агент, при этом концентрации и указанной композиции, и указанного агента при их сочетании являются терапевтически эффективными для лечения или предотвращения комплемент-ассоциированного расстройства (например, комплемент-ассоциированного воспалительного расстройства, такого как ХОБЛ, астма, сепсис или РА) у пациента.

Токсичность и терапевтическая эффективность таких композиций может быть определена посредством известных фармацевтических процедур в клеточных культурах или у экспериментальных животных (например, в моделях на животных любых комплемент-опосредованных расстройств, описанных в настоящем документе). Указанные процедуры можно применять, например, для определения LD₅₀ (дозы, летальной для 50%

популяции) и ED_{50} (дозы, терапевтически эффективной у 50% популяции). Отношение доз, обеспечивающих токсические и терапевтические эффекты, представляет собой терапевтический индекс; он может быть выражен через отношение LD_{50}/ED_{50} . Описанная в настоящем документе композиция, демонстрирующая высокий терапевтический индекс, является предпочтительной. Хотя можно применять и композиции, демонстрирующие токсические побочные эффекты, необходимо обеспечить разработку системы доставки, нацеливающей такие соединения в участок поражения ткани, и минимизировать потенциальное повреждение нормальных клеток, с уменьшением таким образом побочных эффектов.

Данные, полученные в ходе анализа клеточных культур и в исследованиях на животных, можно применять для определения диапазона доз для применения у человека. Дозировка описанной в настоящем документе композиции, как правило, попадает в диапазон циркулирующих концентраций указанных композиций, который включает ED_{50} с незначительной токсичностью или без токсичности. Дозировка может варьировать в пределах указанного диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и способа ведения. Терапевтически эффективная доза для описанной в настоящем документе композиции первоначально может быть определена с помощью анализа клеточных культур. В моделях на животных может быть определена доза, обеспечивающая достижение диапазона циркулирующих концентраций в плазме, который включает IC_{50} (т.е. концентрацию антитела, обеспечивающую полумаксимальное ингибирование симптомов), определенную для клеточной культуры. Такая информация может применяться для более точного определения подходящих для применения у человека доз. Уровни в плазме могут быть измерены, например, при помощи высокoeffективной жидкостной хроматографии. Согласно некоторым вариантам реализации, например, если требуется местное введение (например, в глаз или сустав), клеточная культура или модели на животных можно применять для определения дозы, необходимой для достижения терапевтически эффективной концентрации на локальном участке.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы

могут осуществляться в сочетании с другими вариантами терапии комплемент-ассоциированных расстройств. Например, указанная композиция может вводиться пациенту одновременно, до или после плазмафереза, IVIG-терапии или плазмообмена. См., например, Appel et al. (2005) *J Am Soc Nephrol* 16:1392-1404. Согласно некоторым вариантам реализации композиция может вводиться пациенту одновременно, до или после трансплантации почки.

«Пациент» в настоящем документе может представлять собой любое млекопитающее. Например, пациент может представлять собой человека, не являющегося человеком примата (например, орангутана, гориллу, макака, павиана или шимпанзе), лошадь, корову, свинью, овцу, козу, собаку, кошку, кролика, морскую свинку, песчанку, хомяка, крысу или мышь. Согласно некоторым вариантам реализации пациент представляет собой детеныша или ребенка младшего возраста (например, человека).

В настоящем документе термины «нуждающийся в предотвращении», «нуждающийся в лечении» или «нуждающийся в этом» пациент относится к пациенту, для которого, по мнению соответствующего медицинского специалиста (например, врача, медицинской сестры или фельдшера в случае человека; ветеринара в случае не являющихся человеком млекопитающих), будет в достаточной степени благоприятным определенное лечение.

Термин «предотвращение» известен в данной области техники, при применении в отношении состояния, широко распространен в данной области техники и включает введение композиции, которая уменьшает частоту или задерживает появление симптомов медицинского состояния у пациента относительно пациента, которые не получает описанную в настоящем документе композицию. Соответственно, предотвращение комплемент-ассоциированного расстройства, такого как астма, включает, например, уменьшение выраженности или частоты кашля, бронхообструкции или боли в груди в популяции пациентов, получающих профилактическое лечение, относительно не получающей лечение контрольной популяции, и/или задержку появления кашля или бронхообструкции у получающей лечение популяции относительно не получающей лечения контрольной популяции, например, на статистически и/или

клинически значимом уровне.

Как описано выше, раскрытые в настоящем документе композиции (например, направленные против C5 композиции) можно применять для лечения различных комплемент-ассоциированных расстройств, таких как, не ограничиваясь перечисленными: ревматоидный артрит (РА); волчаночный нефрит; ишемически-реперфузионное повреждение; атипичный гемолитико-уремический синдром (аГУС); типичный или инфекционный гемолитический уремический синдром (соответственно); болезнь плотного осадка (БПО); пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ); рассеянный склероз (МС); макулярная дегенерация (например, возрастная макулярная дегенерация (ВМД)); гемолиз, повышение уровня ферментов печени и тромбоцитопения (HELLP-синдром); сепсис; дерматомиозит; диабетическая ретинопатия; тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП); спонтанная потеря плода; слабоиммунный васкулит; буллезный эпидермолиз; рецидивирующая потеря плода; рассеянный склероз (МС); и травматическое повреждение головного мозга. См., например, Holers (2008) *Immunological Reviews* 223:300-316 и Holers and Thurman (2004) *Molecular Immunology* 41:147-152. Согласно некоторым вариантам реализации указанное комплемент-опосредованное расстройство представляет собой комплемент-опосредованное расстройство сосудов, такое как, не ограничиваясь перечисленными, расстройство сердечно-сосудистой системы, миокардит, цереброваскулярное расстройство, расстройство периферических сосудов (например, костно-мышечной системы), реноваскулярное расстройство, заболевание сосудов брыжейки/ЖКТ, реваскуляризация трансплантатов и/или реимплантатов, васкулит, нефрит при пурпуре Шенлейна-Геноха, ассоциированный с системной красной волчанкой васкулит, связанный с ревматоидным артритом васкулит, васкулит с иммунными комплексами, трансплантация органов или тканей, синдром Такаясу, синдром повышенной проницаемости капилляров, дилатационная кардиомиопатия, диабетическая ангиопатия, торакоабдоминальная аневризма аорты, болезнь Кавасаки (артериит), венозная газовая эмболия (ВГЭ) и рестеноз после размещения стента, ротационная атерэктомия и

чрескожная транслюминальная коронарная ангиопластика (ЧТКА). (См., например, опубликованную заявку на патент США №20070172483.) Согласно некоторым вариантам реализации указанное комплемент-ассоциированное расстройство представляет собой тяжелую миастению, болезнь холодовой агглютинации (БХА), пароксизмальную холодовую гемоглобинурию (ПХГ), дерматомиозит, склеродермию, тепловую аутоиммунную гемолитическую анемию, болезнь Грейвса, тиреоидит Хашимото, диабет I типа, псориаз, пузычатку, аутоиммунную гемолитическую анемию (АГА), идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), синдром Гудпасчера, антифосфолипидный синдром (АФС), болезнь Дегоса и катастрофический антифосфолипидный синдром (КАФС).

Согласно некоторым вариантам реализации описанная в настоящем документе композиция, по отдельности или в комбинации с вторым противовоспалительным агентом, может применяться для лечения воспалительного расстройства, такого как, не ограничиваясь перечисленными, РА (см. выше), воспалительное заболевание кишечника, сепсис (см. выше), септический шок, острое повреждение легких, рассеянная внутрисосудистая коагуляция (РВК) или болезнь Крона. Согласно некоторым вариантам реализации второй противовоспалительный агент может быть выбран из группы, состоящей из НПВС, кортикостероидов, метотрексата, гидроксихлорохина, анти-ФНО агентов, таких как этанерцепт и инфликсимаб, истощающий В-клетки агент, такой как ритуксимаб, антагонист интерлейкина-1, или блокатор костимуляции Т-клеток, такой как абатацепт.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное комплемент-ассоциированное расстройство представляет собой комплемент-ассоциированное неврологическое расстройство, такое как, не ограничиваясь перечисленными, боковой амиотрофический склероз (БАС), повреждение головного мозга, болезнь Альцгеймера и хроническая воспалительная демиелинизирующая нейропатия.

Комплемент-ассоциированные расстройства также включают комплемент-ассоциированные расстройства легких, такие как, не ограничиваясь перечисленными, астма, бронхит, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), интерстициальная легочная

болезнь, дефицит альфа-1-антитрипсина, эмфизема, бронхоэктаз, облитерирующий бронхиолит, альвеолит, саркоидоз, фиброз легких и коллагеноз сосудов.

Согласно некоторым вариантам реализации описанную в настоящем документе композицию вводят пациенту для лечения, предотвращения или облегчения по меньшей мере одного симптома комплемент-ассоциированного воспалительного ответа (например, комплемент-ассоциированного воспалительного ответа при комплемент-ассоциированном расстройстве) у пациента. Например, композиция может применяться для лечения, предотвращения и/или облегчения одного или нескольких симптомов, связанных с комплемент-ассоциированным воспалительным ответом, например, отторжением трансплантата/реакцией «трансплантат против хозяина» (РТПХ), реперфузионными повреждениями (например, после сердечно-легочного шунтирования или трансплантации ткани) и повреждением тканей после другого травматического повреждения, например, ожога (например, тяжелого ожога), тупой травмы, травмы позвоночника или обморожения. См., например, Park et al. (1999) *Anesth Analg* 99(1):42-48; Tofukuji et al. (1998) *J Thorac Cardiovasc Surg* 116(6):1060-1068; Schmid et al. (1997) *Shock* 8(2):119-124; и Bless et al. (1999) *Am J Physiol* 276(1):L57-L63.

Согласно некоторым вариантам реализации описанную в настоящем документе композицию можно вводить пациенту в качестве монотерапии. Как вариант, как описано выше, композицию можно вводить пациенту в составе комбинированной терапии с другим вариантом лечения, например, другим вариантом лечения комплемент-ассоциированного расстройства или комплемент-ассоциированного воспалительного ответа. Например, указанная комбинированная терапия может включать введение указанному пациенту (например, пациенту-человеку) одного или большего числа дополнительных агентов (например, антикоагулянтов, антигипертензивных агентов или противовоспалительных лекарственных средств (например, стероидов)), обеспечивающих благоприятный терапевтический эффект пациенту, страдающему сепсисом или имеющего риск развития сепсиса. В другом примере

комбинированная терапия может включать введение указанному пациенту одного или большего числа дополнительных агентов (например, антитела против IgE, антитела против ИЛ-4, антитела против ИЛ-5 или антигистаминного агента), обеспечивающего благоприятный терапевтический эффект пациенту, страдающему, предположительно страдающему или имеющему риск развития комплемент-ассоциированного расстройства легких, такого как ХОБЛ или астма. Согласно некоторым вариантам реализации композицию и один или большее количество дополнительных активных агентов вводят одновременно. Согласно другим вариантам реализации сначала вводят указанную композицию, а затем вводят один или большее количество дополнительных активных агентов. Согласно некоторым вариантам реализации сначала вводят один или большее количество дополнительных активных агентов, а затем вводят указанную композицию.

Описанная в настоящем документе композиция может заменять или дополнять проводимую ранее или в текущий момент терапию. Например, при лечении описанной в настоящем документе композицией введение одного или большего числа дополнительных активных агентов может быть прекращено или ограничено, например, могут вводиться меньшие дозы, например, меньшие дозы экулизумаба после введения описанной в настоящем документе направленной против C5 композиции. Согласно некоторым вариантам реализации ранее применявшаяся терапия может продолжаться. Согласно некоторым вариантам реализации ранее применявшаяся терапия продолжается до того момента, пока не достигается уровень указанной композиции, достаточный для обеспечения терапевтического эффекта. Указанные два варианта терапии можно применять в комбинации.

Мониторинг улучшений у пациента (например, пациента-человека) при расстройстве (например, сепсисе, тяжелом ожоге, РА, волчаночном нефрите, синдроме Гудпасчера или астме) согласно определению в настоящем документе относится к оценке изменений показателей заболевания у указанного пациента, например, ослабления одного или большего числа симптомов определенного расстройства. Симптомы многих перечисленных выше

расстройств (например, комплемент-ассоциированных расстройств) хорошо известны в области медицины. Согласно некоторым вариантам реализации указанную оценку осуществляют в течение по меньшей мере одного (1) часа, например, по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 24 или 48 часов, или по меньшей мере 1 дня, 2 дней, 4 дней, 10 дней, 13 дней, 20 дней или более, или по меньшей мере 1 недели, 2 недель, 4 недель, 10 недель, 13 недель, 20 недель или более, после введения описанной в настоящем документе композиции. Оценка состояния пациента может проводиться в течение одного или нескольких периодов времени: до начала лечения; во время лечения; или после введения одного или нескольких компонентов лечения. Оценка может включать оценку необходимости дальнейшего лечения, например, оценку необходимости изменения дозировки, частоты введения или продолжительности лечения. Она также может включать оценку необходимости добавления или прекращения выбранного терапевтического воздействия, например, добавления или прекращения любого варианта лечения комплемент-ассоциированного расстройства как описано в настоящем документе.

Следующие далее примеры являются исключительно иллюстративными и не должны толковаться как каким-либо образом ограничивающие объем настоящего изобретения, поскольку для специалистов в данной области техники после прочтения настоящего описания будет очевидным наличие множества вариантов и эквивалентов. Все цитируемые в настоящем документе патенты, патентные заявки и публикации полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Период полувыведения экулизумаба представляет собой комбинацию нескольких скоростей выведения

Средний период полувыведения экулизумаба у пациентов с ПНГ и аГУС, получающих его согласно предписанному режиму дозирования, составляет приблизительно 11-12 дней, тогда как ожидаемый период полувыведения гуманизированного моноклонального антитела, содержащего Fc IgG2/4, предположительно аналогичен периоду полувыведения антитела,

содержащего Fc IgG2 или IgG4, и составляет приблизительно 21-28 дней. Morell et al. (1970) *J Clin Invest* 49(4):673-680. Для понимания потенциального влияния антиген-опосредованного выведения на общую скорость выведения экулизумаба проводили следующие эксперименты с применением модели на мышах, несущих неонатальный Fc-рецептор человека (hFcRn) (у указанных мышей отсутствует эндогенный FcRn, однако имеется трансген hFcRn (B6.Cg-Fcgrt^{tm1Dcr} Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJ; складской номер 014565, Jackson Laboratories, Бар Харбор, Мэн)). Модель на трансгенных по FcRn животных была описана, например, в источниках: Petkova et al. (2006) *Int Immunology* 18(12):1759-1769; Oiao et al. (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 105(27):9337-9342; и Roopenian et al. (2010) *Methods Mol Biol* 602:93-104.

Одну дозу экулизумаба, 100 мкг в 200 мкл забуференного фосфатом солевого раствора (ФСБ), вводили посредством внутривенной (в/в) инъекции каждой из пяти несущих hFcRn трансгенных мышей. У каждой мыши брали образцы крови объемом приблизительно 100 мкл на 1, 3, 7, 14, 21, 28 и 35 день после введения. Концентрацию экулизумаба в сыворотке измеряли с применением ИФА ELISA. Вкратце, аналитические планшеты покрывали антителом овцы для захвата легкой цепи IgG человека и блокировали. Затем лунки планшета приводили в контакт с образцами сыворотки в условиях, позволяющих экулизумабу, в случае его присутствия в сыворотке, связываться с антителом для захвата. Относительное количество связанного экулизумаба в каждой лунке детектировали с применением детектируемо меченого антитела против IgG4 человека и количественно определяли по стандартной кривой, полученной для нестимулированной сыворотки мыши, содержащей известные количества экулизумаба.

Период полувыведения антитела в сыворотке вычисляли с применением следующей формулы:

$$\text{Период полувыведения} = T \times \frac{\ln 2}{\ln \frac{A_0}{A_t}}$$

где: T = прошедший период времени, A₀ = исходная концентрация в сыворотке антитела (концентрация на 1-й день в

настоящем исследовании) и A_t = количество антитела, оставшееся по истечении периода времени T (минимальная детектируемая концентрация или момент времени последнего взятия крови (день 35) в настоящем исследовании).

Результаты указанного эксперимента представлены на Фиг. 1. Период полувыведения экулизумаба в модели на мышах hFcRn составлял $13,49 \pm 0,93$ дней.

Для определения эффекта C5 человека на период полувыведения экулизумаба с применением модели hFcRn антитело предварительно смешивали в соотношении 4:1 с C5 человека (Complement Technology Inc., кат.№: A120) до дозирования. Дозу экулизумаба 100 мкг внутривенно (в/в) вводили на 0 день. Приблизительно 100 мкл крови собирали в пробирки Eppendorf 1,5 мл для сыворотки из ретроорбитального синуса на 1, 3, 7, 14, 21, 28 и 35 день.

Как показано на Фиг. 1, период полувыведения экулизумаба в модели на мышах hFcRn в присутствии C5 составлял $4,55 \pm 1,02$ дня. Эти результаты показывают, что, помимо механизмов опосредованного эндоцитозом выведения антител, при котором продолжительный период полувыведения в значительной степени обусловлен опосредованным FcRn рециклингом, на период полувыведения экулизумаба может значительно влиять антиген-опосредованное выведение за счет C5 человека.

Пример 2. Замены аминокислот в Fc-домене экулизумаба увеличивает период полувыведения экулизумаба, однако в недостаточной для преодоления эффекта C5 на выведение экулизумаба степени

Определенные замены аминокислот в Fc-области антитела IgG, как было показано, уменьшают скорость выведения антитела из кровотока. Замены, повышающие сродство к связыванию антитела IgG к FcRn при значении pH 6,0, являются примерами такого биологического эффекта. См., например, Dall'Acqua et al. (2006) *J Immunol* 117:1129-1138 и Ghetie et al. (1997) *Nat Biotech* 15: 637-640. Zalevsky et al. [(2010) *Nat Biotech* 28:157-159] где описан ряд замен аминокислот, например, M428L/N434S, способных

увеличивать период полувыведения антитела IgG в сыворотке. Другие увеличивающие период полувыведения замены аминокислот включают, например, T250Q/M428L и M252Y/S254T/T256E. См., например, опубликованную международную заявку на патент WO 2008/048545 и Dall'Acqua et al. (2006) *J Biol Chem* 281:23514-23524. Для определения способности одной или большего количества замен аминокислот в константной области Fc экулизумаба увеличивать период полувыведения экулизумаба в сыворотке, в экулизумаб вводили следующие замены: M252Y/S254T/T256E, согласно нумерации EU (далее в настоящем документе указанный вариант экулизумаба называется вариантом YTE). Константная область тяжелой цепи состояла из следующей последовательности аминокислот:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVTSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:15). Последовательность аминокислот полноразмерного полипептида тяжелой цепи варианта YTE экулизумаба приведена в последовательности SEQ ID NO:16.

Вариант YTE оценивали наряду с экулизумабом в модели на мышях hFcRn, описанной в примере 1. А именно, 100 мкг экулизумаба (Fc-область IgG2/4), вариант экулизумаба, содержащий Fc, или вариант YTE экулизумаба в 200 мкл забуференного фосфатом солевого раствора (ФСБ) вводили посредством внутривенной (в/в) инъекции каждой из восьми трансгенных по hFcRn мышей. У каждой мыши брали сыворотку на 1, 3, 7, 14, 21, 28, и 35 день после введения. Концентрацию каждого антитела в сыворотке измеряли с применением ИФА ELISA и рассчитывали период полувыведения как описано в Примере 1. Результаты представлены на Фиг. 2 и в Таблице 2.

Таблица 2

<u>Тестируемое антитело</u>	<u>Период полувыведения</u>	<u>Стандартная ошибка (SE)</u>
-----------------------------	---------------------------------	------------------------------------

Экулизумаб	13,49	0,93
Экулизумаб-IgG2	14,28	1
Экулизумаб-IgG2-YTE	29,07	4,7

Как показано на Фиг. 2 и в Таблице 2, замена YTE увеличивала среднее периода полувыведения экулизумаба более чем в 2 раза, с $14,28 \pm 1$ дня до $29,07 \pm 4,7$ дня.

Для определения эффекта C5 человека на период полувыведения варианта YTE экулизумаба мышам вводили C5 человека, как описано выше в Примере 1. Дозу экулизумаба 100 мкг, вариант экулизумаб/IgG2, или вариант YTE экулизумаб/IgG2 внутривенно вводили на 0 день. Как показано на Фиг. 3 и в Таблице 3, период полувыведения экулизумаба, варианта экулизумаба/IgG2 и варианта YTE экулизумаба/IgG2 значительно уменьшалось в присутствии молярного избытка C5 человека. Соответственно, замен аминокислот в связывающем FcRn домене экулизумаба было недостаточно для преодоления влияния опосредованного C5 выведения на период полувыведения экулизумаба.

Таблица 3

<u>Тестируемое антитело</u>	<u>T_{1/2}</u>	<u>Стандартная ошибка (SE)</u>
Экулизумаб	13,49	0,93
Экулизумаб-IgG2	14,28	1
Экулизумаб-IgG2 (YTE)	29,07	4,7
Экулизумаб + hC5	4,55	1,02
Экулизумаб-IgG2 + C5	2,11	0,31
Экулизумаб-IgG2 (YTE) + hC5	4,28	1,09

Пример 3. Эффект замен аминокислот в областях CDR экулизумаба на период полувыведения

Как описано выше, период полувыведения экулизумаба у мышей значительно укорачивается в присутствии антигена, C5 человека (hC5). Без связи с конкретной теорией или механизмом действия,

предполагается, что ускорение выведения в присутствии антигена представляет собой, отчасти, результат очень высокого сродства экулизумаба к C5 ($K_D \sim 30$ пМ при значении pH 7,4 и ~ 600 пМ при значении pH 6,0), не предотвращающего эффективную диссоциацию комплекса антитело:C5 в ранних эндосомальных компартментах после пиноцитоза. В отсутствие диссоциации комплекс антитело:антиген либо возвращается во внеклеточный компартмент через неонатальный Fc-рецептор (FcRn), либо направляется к месту лизосомальной деградации. В любом случае антитело неспособно к связыванию более чем двух молекул C5 в течение периода своего существования.

Сильное сродство экулизумаба к C5 ($K_D \sim 30$ пМ) обеспечивает практически полное связывание всех молекул C5 в крови и гарантирует, что только очень незначительное количество C5 активируется с образованием C5a и ТКК. Таким образом, сродство экулизумаба к C5 непосредственно связано с эффективностью антитела *in vivo* у пациентов, получающих лечение указанным антителом. Авторы настоящего изобретения поставили задачу ослабить сродство экулизумаба к C5 без уменьшения эффективности экулизумаба *in vivo*. Это достигалось, без ограничения настоящего изобретения таким подходом, путем введения гистидина в одно или большее число положений в областях CDR экулизумаба. рКа гистидина составляет 6,04. Это означает, что по мере уменьшения значений pH с 7,4 (кровь) до менее чем 6,0 (ранние эндосомы), гистидины приобретают протон. Соответственно, в эндосоме гистидины приобретают больший положительный заряд. Авторы настоящего изобретения предположили, что при введении в экулизумаб гистидинов в сайте связывания C5 или рядом с ним изменение заряда в эндосоме будет нарушать связывание в эндосоме, при сохранении высокого сродства к C5 при нейтральном значении pH в крови. Такие замены предположительно будут увеличивать период полувыведения, способствуя отделению антитела при диссоциации комплекса антитело:C5 в кислой среде эндосомы, обеспечивая рециклинг свободного антитела при разложении C5 в лизосоме.

Используя экулизумаб в качестве исходного антитела, получали ряд вариантов антител, где в каждом положении в составе CDR была осуществлена замена на гистидин. Варибельная область тяжелой цепи экулизумаба имеет следующую последовательность аминокислот:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFSNYWIQWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTEYTENFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARYFFGSSPNWYFDVWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO:7). (Области CDR варибельной области тяжелой цепи выделены подчеркиванием.) Варибельная область легкой цепи экулизумаба имеет следующую последовательность аминокислот: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNWYQQKPGKAPKLLIYGATNLADGVPSRFSGSSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQNVLNTPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:8).

В результате проведения указанного гистидинового сканирования получали 66 вариантов экулизумаба с одиночными заменами на гистидин. Кодировующие последовательности легкой цепи и тяжелой цепи указанных вариантов антитела клонировали в отдельные плазмидные «одногенные конструкции», подходящие для экспрессирования в клетках млекопитающих и подтверждали последовательности. Антитела, содержащие одиночную замену аминокислоты транзигентно экспрессировали в клетках HEK293F посредством котрансфекции одногенными конструкциями, кодирующими одиночную легкую цепь или тяжелую цепь. Также проводили котрансфекцию тяжелой и легкой цепями «дикого типа», представляющих немодифицированные последовательности CDR экулизумаба (EHL000). Культуральные супернатанты нормировали по уровню экспрессии антитела и использовали для оценки связывания антитела с C5 человека относительно EHL000, с применением биослойной интерферометрии с помощью инструмента Octet Red (ForteBio Inc.). Вкратце, антитела захватывали на биосенсоре с антителами против Fc IgG человека (ForteBio, кат.№18-5001). Затем на нагруженные наконечники воздействовали забуференным раствором с pH 7,4, содержащим 12,5 нМ природный очищенный C5 человека, в течение 800 секунд для оценки кинетики связывания относительно исходного антитела. Кинетику диссоциации оценивали, перенося наконечник в забуференный раствор с pH 7,4 или pH 6,0 на 800 секунд. Все измерения повторяли для

подтверждения согласованности считываемых данных.

Варианты экулизумаба с одиночной заменой на гистидин выбирали на основании совокупности трех свойств, проводя сравнение с экулизумабом. Константы k_a и k_d предпочтительных гистидиновых вариантов лишь незначительно отличались от k_a и k_d экулизумаба при значении pH 7,4, однако их k_d отличалась от k_d экулизумаба в большей степени при значении pH 6,0. Относительные пороговые значения, определяющие критерии выбора, были следующими:

максимальная дисперсия для кинетики связывания при значении pH 7,4 с уменьшением пикового фазового сдвига на 33% через 800 секунд по сравнению с усредненным пиковым фазовым сдвигом через 800 секунд, наблюдаемым для экулизумаба;

максимальная дисперсия для кинетики диссоциации при значении pH 7,4 с уменьшением пикового фазового сдвига максимум в 3 раза за 800 секунд по сравнению с усредненным пиковым фазовым сдвигом через 800 секунд, наблюдаемым для экулизумаба;

и

минимальная дисперсия для кинетики диссоциации при значении pH 6,0 с уменьшением пикового фазового сдвига минимум в 3 раза за 800 секунд по сравнению с усредненным пиковым фазовым сдвигом через 800 секунд, наблюдаемым для экулизумаба.

Например, согласно пункту (1) выше, в том случае, если средний пиковый фазовый сдвиг через 800 секунд связывания с экулизумабом составляет приблизительно 0,75 нм, экспериментальное антитело со значением фазового сдвига, составляющим менее 0,5 нм (например, 2х или более) не удовлетворяет вышеперечисленным критериям. Напротив, экспериментальное антитело, пиковый фазовый сдвиг для которого превышает 0,5 нм через 800 секунд, отвечает первому критерию.

Были обнаружены следующие одиночные замены в вариабельной области легкой цепи, обеспечивающие соответствие указанным пороговым значениям: G31H, L33H, V91H, и T94H, все в последовательности SEQ ID NO:8. Были обнаружены следующие одиночные замены в вариабельной области тяжелой цепи, обеспечивающие соответствие указанным пороговым значениям:

Y27H, I34H, L52H, и S57H, все в последовательности SEQ ID NO:7. См. Фиг. 5A, 5B, 5C и 5D.

Получали вторую группу антител, содержащих все возможные комбинации двух замен на гистидин в положениях, где одиночные замены обеспечивали соответствие пороговым значениям. См. Таблицу 1. Кинетику связывания и диссоциации анализировали с применением тех же способы и проводили сравнение как с исходным антителом, так и с содержащим одиночную гистидиновую замену антителом. Аналогичным образом получали третью и четвертую группы антител, содержащих три или четыре гистидиновые замены, соответственно, и анализировали кинетику связывания и диссоциации, проводя сравнение с соответствующими предшественниками, содержащими две или три гистидиновых замены. См. Таблицу 1. На каждом этапе использовали одинаковые критерии минимальных пороговых значений для кинетики связывания при значении pH 7,4, максимальных пороговых значений для кинетики диссоциации при значении pH 7,4, и минимальных пороговых значений для кинетики диссоциации при значении pH 6. Восемь комбинаций замен отвечали вышеуказанным критериям и были отобраны для определения аффинности при значениях pH 7,4 и pH 6,0 с применением ППР. Значения аффинности приведены в Таблице 4.

Таблица 4.

<u>Наименование</u> <u>клона</u>	<u>Последовательность</u> <u>VL</u>	<u>Последовательность</u> <u>VH</u>	<u>KD pH</u> <u>7,4 (нМ)</u>	<u>KD pH 6,0</u> <u>(нМ)</u>	<u>Отношение KD при</u> <u>pH 6,0/ pH 7,4</u>
Экулизумаб	SIN:8	SIN:7	0,033	0,685	21
EHL000	SIN:8	SIN:7	0,018	0,419	24
EHL001	G31H, относительно SIN:8,	SIN:7	0,330	1900	5758
EHL004	G31H, относительно SIN:8,	S57H	0,135	374	2770
EHL046	G31H, относительно SIN:8,	SIN:7, с: Y27H, L52H	1,150	Н.О.	Н.П.
EHL049	G31H, относительно SIN:8,	SIN:7, с: Y27H, S57H	0,573	Н.О.	Н.П.
EHL055	G31H, относительно SIN:8,	SIN:7, с: I34H, S57H	0,623	2550	4093
EHG302	SIN:8	SIN:7, с: Y27H, L52H	0,289	10,0	35

EHG303	SIN:8	SIN:7, с: Y27H, S57H	0,146	1190	8151
EHG305	SIN:8	SIN:7, с: I34H, S57H	0,160	10,8	68

*SIN относится к SEQ ID NO.

При указанных комбинациях замен сродство экулизумаба к С5 уменьшалось более чем 1000-кратно при значении pH 6,0, при этом при значении pH 7,0 сродство уменьшалось не более чем в 20 раз. На этом основании для дальнейшего анализа был выбран EHG303 (Таблица 4) ввиду высокой аффинности при значении pH 7,4 (0,146 нМ) и отношения (K_D при значении pH 6,0) / (K_D при значении pH 7,4), превышающего 8000. Полипептид тяжелой цепи антитела EHG303 содержит следующую последовательность аминокислот:

MGWSCIIILFLVATATGVHS*LEQVQLVQSGAEVKKPGASVKV*SCKASGHIFSNYWIQWV
RQAPGQGLEWMGEILPGSGHTEYTENFKDRVMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARYF
FGSSPNWYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTKVERKCCV
ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK
SRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:24). Полипептид
легкой цепи антитела EHG303 содержит следующую
последовательность аминокислот:

MGWSCIIILFLVATATGVHS*RDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALN*WYQQKPGKA
PKLLIYGATNLDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNVLTPLTFTGQGTKVEI
KRTRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:25).
В приведенных выше последовательностях выделенные
подчеркиванием фрагменты соответствуют лидерной
последовательности каждого полипептида, а выделенные курсивом
фрагменты представляют собой гетерологичные аминокислоты,
встроенные путем клонирования.

Также было отобрано антитело EHL049. Полипептид его тяжелой цепи содержит следующую последовательность аминокислот:

MGWSCIIILFLVATATGVHS*LEQVQLVQSGAEVKKPGASVKV*SCKASGHIFSNYWIQWV
RQAPGQGLEWMGEILPGSGHTEYTENFKDRVMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARYF
FGSSPNWYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTKVERKCCV
ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK

SRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:26). Полипептид легкой цепи антитела EHL049 содержит следующую последовательность аминокислот:

MGWSCIIILFLVATATGVHS *RD*IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYHALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNVLTPLTFGGGTKVEIKRTRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:27).

В приведенных выше последовательностях выделенные подчеркиванием фрагменты соответствуют лидерной последовательности каждого полипептида, а выделенные курсивом фрагменты представляют собой гетерологичные аминокислоты, встроенные путем клонирования.

Наконец, полипептид тяжелой цепи EHL000 содержит следующую последовательность аминокислот:

MGWSCIIILFLVATATGVHS *LE*QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFSNYWIQWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTEYTENFKDRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARYFPGSSPNWYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCV ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:28). Полипептид легкой цепи антитела EHL000 содержит следующую последовательность аминокислот:

MGWSCIIILFLVATATGVHS *RD*IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNVLTPLTFGGGTKVEIKRTRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:29). В приведенных выше последовательностях выделенные подчеркиванием фрагменты соответствуют лидерной последовательности каждого полипептида, а выделенные курсивом фрагменты представляют собой гетерологичные аминокислоты, встроенные путем клонирования.

Пример 4. Гистидиновые замены увеличивают период полувыведения экулизумаба в сыворотке

Полипептид легкой цепи и полипептид тяжелой цепи каждого

из описанных выше антител EHL и ENG экспрессировали из одногенные конструкций. Кодировующие последовательности тяжелой и легкой цепей ENG303 комбинировали в двухгенном экспрессионном векторе, как и последовательности легкой и тяжелой цепи антитела EHL049. Полученный клон ENG303 обозначили как BNJ421 и полученный клон EHL049 обозначили как BNJ423. Последовательность аминокислот вариабельной области тяжелой цепи BNJ421 представлена следующей последовательностью:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGHIFSNYWIQWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGHTEYTEN
FKDRVMTMRDSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARYFFGSSPNWYFDVWGQGTLLVTVSS

(SEQ ID NO:12). Последовательность аминокислот вариабельной области легкой цепи BNJ421 представлена следующей последовательностью:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLADGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNVLNTPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:8).

Вариабельная область тяжелой цепи антитела BNJ423 содержит следующую последовательность аминокислот:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGHIFSNYWIQWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGHTEYTENFKDRVMTMRDSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARYFFGSSPNWYFDVWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO:12). Последовательность аминокислот легкой цепи BNJ423 представлена следующей последовательностью:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYHALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLADGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNVLNTPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:18).

Указанные две молекулы оценивали наряду с EHL000 у мышей с иммунодефицитом (NOD/scid) и дефицитных по C5. Однократную дозу 100 мкг EHL000, BNJ421, или BNJ423 в 200 мкл забуференного фосфатом солевого раствора (ФСБ) вводили посредством внутривенной (в/в) инъекции каждой из восьми мышей. У каждой мыши брали сыворотку на 1, 3, 7, 14, 21, 28 и 35 день после введения. Концентрацию каждого антитела в сыворотке измеряли с применением ИФА ELISA. Период полувыведения антитела в сыворотке вычисляли с применением программного обеспечения Pharsight Phoenix® WinNonlin®, версия 6.3 с применением некомпартментного анализа (НКА) и модели прямого отклика Emax. Процент остающегося в сыворотке антитела вычисляли следующим образом:

$$\% \text{ оставшегося антитела} = \frac{C_t}{C_1} \times 100$$

где C_t = Концентрация антитела в конкретный день; и C_1 = Концентрация антитела на 1 день.

Результаты представлены на Фиг. 6 и в Таблице 5.

Таблица 5.

<u>Протестированное</u> <u>антитело (AT)</u>	<u>T $\frac{1}{2}$ в сыворотке</u> <u>(дни)</u>	<u>Стандартная ошибка</u> <u>(SE)</u>
EHL000	22,18	1,01
BNJ421	25,29	0,81
BNJ423	24,69	2,16

Для определения эффекта C5 человека на период полувыведения указанных антител с применением той же модели на мышцах мышам вводили C5 человека подкожно в нагрузочной дозе, составляющей 250 мкг на -1 день (за сутки до введения мышам антител) с последующим дозированием дважды в сутки 50 мкг C5 для поддержания в сыворотке концентрации C5 приблизительно на уровне 20 мкг/мл (как описано в Примере 1).

Как показано на Фиг. 7 (и в Таблице 6 ниже), период полувыведения EHL000 (экулизумаб-IgG1) в модели на мышцах в присутствии C5 человека (hC5) (в концентрации, превышающей молярное отношение 1:1 C5 и экулизумаба) составлял $2,49 \pm 0,34$ дня, тогда как период полувыведения антител BNJ421 и BNJ423 (содержащих гистидиновые замены) был существенно выше, составляя $15,25 \pm 0,90$ дня и $22,71 \pm 0,71$ дня, соответственно. Это показывает, что гистидиновые замены в областях CDR экулизумаба и итоговое pH-зависимое сродство к C5 значительно снижают скорость выведения вариантов экулизумаба из сыворотки по сравнению с экулизумабом.

Таблица 6.

<u>Протестированные антитела</u>	<u>T $\frac{1}{2}$ в сыворотке (дни)</u>	<u>SE</u>
EHL000	22,18	1,01
BNJ421	25,29	0,81
BNJ423	24,69	2,16

ЕНL000+hC5	2,49	0,34
BNJ421+hC5	15,25*	0,90
BNJ423+hC5	22,71	1,19

*Значимо относительно ЕНL000+hC5.

Пример 5. Варианты экулизумаба с заменами на гистидин не утрачивают комплемент-ингибирующую активность

Дополнительно оценивали гемолитическую активность в сыворотке в каждом из образцов, содержащих C5 человека, в экспериментах, описанных в Примере 4. Активность терминального каскада комплемента в сыворотке мышей определяли путем оценки способности к лизису эритроцитов курицы. Поскольку используемые мыши дефицитны по C5, гемолитическая активность непосредственно отражает активность C5 человека в образце. Вкратце, антитела в концентрации 50, 3 и 0 мкг/мл в вероналовом солевом буфере с желатином (GVBS) (Comptech, кат.№ B100), содержащем 0,1% желатина, 141 мМ NaCl, 0,5 мМ MgCl₂, 0,15 мМ CaCl₂ и 1,8 мМ барбитал натрия, использовали в качестве контроля, обеспечивающего низкий уровень лизиса, средний уровень лизиса и 100% лизис, соответственно. Экспериментальные образцы получали путем разведения экспериментальной сыворотки мыши 1:10 в GVBS. Аликвоты образцов (50 мкл) распределяли в соответствующие лунки 96-луночного планшета в трех повторностях (Corning; Тьюксбери, Массачусетс, кат. №3799), содержащие равные объемы 20% C5-дефицитной сыворотки мыши и 20% сыворотки человека (Bioreclamation, кат. №HMSRM-COMP+) в GVBS в контрольных лунках и равные объемы 20% C5-дефицитной сыворотки мыши и 20% истощенной по C5 сыворотки человека (Complement Technologies, кат. № A320) в GVBS в лунках с экспериментальными образцами. ЭДТК (2 мкл, 500 мМ, Sigma, кат. № E-9884) добавляли в третью лунку и для контроля, и для образцов для получения контроля сыворотки «без гемолиза» для калибровки цвета. Эритроциты курицы промывали в GVBS, сенсibilizировали для активации классического пути комплемента путем инкубирования с поликлональным антителом против эритроцитов курицы (Intercell Technologies; 0,1% по объему) при 4°C в течение 15 минут,

повторно промывали и ресуспендировали в GVBS до конечной концентрации, составляющей $\sim 7,5 \times 10^7$ клеток/мл. Сенсibilизированные эритроциты курицы ($\sim 2,5 \times 10^6$ клеток) добавляли в планшет, содержащий контроль и образцы, непродолжительно перемешивали на планшетном шейкере и инкубировали при 37°C в течение 30 минут. Реагенты повторно перемешивали, центрифугировали при 845x g в течение 3 минут, и переносили 85 мкл супернатанта в лунки 96-луночного плоскодонного микротитровального планшета (Nunc, Пенфилд, Нью-Йорк, кат. №439454). Поглощение измеряли при 415 нм с помощью ридера для микропланшетов; процент гемолиза определяли по следующей формуле:

$$\% \text{ гемолиза} = \frac{OD \text{ образца} - OD \text{ цветокалибровочного контрольного образца}}{OD \text{ контроля со 100\% лизисом} - OD \text{ цветокалибровочного контрольного образца со 100\% лизисом}} \times 100$$

где OD = оптическая плотность.

Как показано на Фиг. 8, несмотря на незначительное снижение аффинности относительно экулизумаба при значении pH 7,4, и BNJ421, и BNJ423 сохраняли способность к связыванию практически всех молекул C5 человека, присутствующих в кровотоке, и к ингибированию гемолиза. Эти результаты показывают, что сродство экулизумаба к C5 может быть ослаблено без уменьшения эффективности антитела *in vivo*, с обеспечением увеличения периода полувыведения указанного антитела в сыворотке.

Пример 6. pH-зависимое связывание с C5 и усиление FcRn-опосредованного рециклинга увеличивают период полувыведения вариантов экулизумаба в сыворотке

Как показано выше, в присутствии C5 человека период полувыведения варианта экулизумаба с гистиридиновыми заменами был значимо более продолжительным у трансгенных мышей. Для оценки потенциальных суммарных эффектов pH-зависимого связывания с C5 и FcRn на фармакокинетику (ФК) и фармакодинамику (ФД) антител против C5 в присутствии конститутивно синтезируемого C5 и FcRn человека проводили ряд ФК/ФД-экспериментов с применением антител против C5 мыши с константными областями человека у трансгенных мышей, экспрессирующих FcRn человека. Указанные

антитела мыши против C5 конструировали из вариабельной области BB5.1, антитела мыши, служащего фармакологическим суррогатом экулизумаба за счет связывания C5 мыши и предотвращения его расщепления на метаболически активные фрагменты C5a и C5b [De Vries et al. (2003) *Transplantation* 3:375-382]. Конструировали высокоаффинное антитело против C5 мыши (обозначаемое как BHL011), содержащий вариант вариабельных областей мыши BB5.1 с оптимизированной аффинностью и константные области Igκ человека и IgG2/G4 человека. pH-зависимый вариант BHL011 конструировали путем включения трех гистидиновых замен в вариабельные области мыши (указанный вариант обозначается как BHL006). Третье антитело конструировали путем включения двух замен аминокислот в константную область тяжелой цепи человека (M428L, N434S) для повышения сродства к hFcRn (указанный вариант обозначается как BHL009).

Последовательность аминокислот полипептида легкой цепи BHL006 представлена следующей последовательностью:

NIMMTQSPSSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAS
TRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCAQHLSHRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL
TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:30).

Последовательность аминокислот полипептида тяжелой цепи антитела BHL006 представлена следующей последовательностью:

QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSSWMHWVKQRPGQGLEWIGVIDPHDSYT
NYNQKFKGKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGGGSSYNRYFDVWGTGTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHLEAHNHY
TQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:31).

Последовательность аминокислот полипептида легкой цепи BHL009 представлена следующей последовательностью:

NIMMTQSPSSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAS
TRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCAQHLSHRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL

TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:32).

Последовательность аминокислот полипептида тяжелой цепи BHL009 представлена следующей последовательностью:

QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSSWMHWVKQRPGQGLEWIGVIDPHDSYT
NYNQKFKGKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGGGSSYNRYFDVWGTGTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHSHY
TQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:33).

Последовательность аминокислот полипептида легкой цепи BHL011 представлена следующей последовательностью:

NIMMTQSPSSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAS
TRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCAQYLSSRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL
TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:34).

Последовательность аминокислот полипептида тяжелой цепи BHL011 представлена следующей последовательностью:

QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSSWMHWVKQRPGQGLEWIGVIDPSDSYT
NYNQKFKGKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGGGSSYNRYFDVWGTGTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVLMHEALHNY
TQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:35).

Кинетика связывания BHL011, BHL006 и BHL009 с очищенным антителом мыши определяли посредством ППР с помощью инструмента BIACore 3000 с применением метода захвата Fc человека. Вкратце, антитела против Fc человека (KPL, кат. №: 01-10-20) разведенные до 0,1 мг/мл в 10 мМ ацетате натрия pH 5,0, иммобилизовали на двух проточных ячейках CM5-чипа в течение 8 минут путем проведения реакции сочетания аминов. Антитела разводили до 0,25 мкг/мл в подвижном буфере (HBS-EP; 0,01 М HEPES pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЭДТК, 0,005% реагента Surfactant P20 по объему; GE

Life Sciences, кат. №: BR1001-88). Разведенное антитело затем вводили в одну проточную ячейку с последующим введением 6 нМ С5 мыши в обе ячейки. Вторую проточную ячейку использовали в качестве эталонной поверхности. Связывание оценивали при значении рН 7,4 и рН 6,0. Поверхность каждый раз регенерировали 20 мМ HCl, 0,01% P20. Данные обрабатывали в модели Ленгмюра 1:1 программного обеспечения BIAevaluation 4.1 с применением «двойного сравнения». Диссоциацию комплексов BHL011, BHL006 и BHL009 с С5 мыши при значении рН 6,0 оценивали аналогичным образом, вводя 6 нМ С5 мыши (рН 7,4) с последующим введением буфера HBS-EP (рН 6,0). Результаты указанных экспериментов приведены в Таблице 7.

Таблица 7.

	Скорость связывания: K_a (1/M*s)		Скорость диссоциации: K_d (1/s)		Константа диссоциации: K_D (нМ)		Хи-квадрат		% диссоциации через 300 с	
	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0
АТ	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0
BHL011	$6,44 \times 10^5$	$2,39 \times 10^3$	$6,13 \times 10^{-5}$	$1,28 \times 10^{-4}$	0,0952	53,6	0,0194	0,048	1	7
BHL006	$2,93 \times 10^5$	Н.С.	$1,02 \times 10^{-3}$	Н.С.	3,49	Н.С.	0,021	Н.С.	28	100
BHL009	$2,61 \times 10^5$	Н.С.	$1,09 \times 10^{-3}$	Н.С.	4,19	Н.С.	0,0234	Н.С.	28	100

* «Н.С.» специфическое связывание не наблюдалось; «АТ» относится к названию антитела.

Для определения эффектов pH-зависимого связывания с C5 на фармакокинетику (ФК) антитела против C5 в присутствии конститутивно синтезируемого C5 и потенциального влияния усиленного FcRn-рециклинга на дополнительное увеличение периода полувыведения анализировали общую концентрацию в сыворотке BNL011, BNL006 и BNL009 с применением модели на трансгенных по FcRn мышах, описанной в Примере 1. Значения общей концентрации антитела в сыворотке и концентрации в сыворотке как процент относительно концентрации в 1 день приведены на Фиг. 9-11. Данные для самцов мышей показаны сплошной линией, данные для самок - пунктирной линией. Общие концентрации антитела в сыворотке на 1-й день были выше у самок по сравнению с самцами, пропорционально различиям в массе тела и объему распределения. Указанное гендерное различие вносило вклад в интрасубъектную изменчивость фармакокинетики BNL011 среди животных, вероятно, обусловленную нелинейной дозозависимостью ввиду опосредованного C5 выведения (Фиг. 9А и 9В). В целом, интрасубъектная изменчивость среди животных для BNL006 (Фиг. 10А и 10В) и BNL009 (Фиг. 11А и 11В) была незначительной, за исключением одной самки в когорте, получавшей BNL006 (2939), у которой наблюдалось ускоренное выведение. Причины ускоренного выведения у животного 2939 неизвестны.

В присутствии конститутивно синтезируемого C5 и hFcRn среднее значение периода полувыведения в конечной фазе высокоаффинного антитела IgG2/4 против C5 (BNL011) составлял 6 дней; антитело выводилось из кровотока на ~ 98% через 21 день (Фиг. 12 и 13; Таблица 8). Среднее значение скорости выведения pH-зависимого антитела против C5, содержащего Fc-область IgG2/4 (BNL006), уменьшалось; среднее значение периода полувыведения в бета-фазе составляло 16-19 дней. Дополнительное ~ 2-кратное увеличение продолжительности периода полувыведения наблюдалось для pH-зависимого антитела против C5, содержащего Fc-область IgG2/4 с повышенным сродством к hFcRn (период полувыведения BNL009 ~ 36 дней). Указанные показатели согласуются с наблюдаемыми для антител IgG2/4, содержащих или не содержащих

замены M428L, N434S в отсутствие антигена у мышей с hFcRn. Указанные результаты демонстрируют, что pH-зависимое связывание C5 и повышенное сродство к FcRn обеспечивают суммарные эффекты, увеличивающие продолжительность ФК-экспозиции для антител против C5.

Таблица 8.

Антитело	Условный номер животного	Пол	Масса тела (г)	C _{МАХ} (мкг/мл)	Период полувыведения (дни)
BHL011	2929	М	37,8	519,8	7,2
	2930	М	33,5	512,2	7,1
	2963	Ф	23,2	805,0	6,2
	2964	Ф	20,2	814,6	5,0
	2965	Ф	23,4	823,5	4,4
					Среднее = 6,0
BHL006	2905	М	37,5	361,6	15,4
	2906	М	36,1	378,8	19,1
	2939	Ф	21,8	836,0	4,6
	2940	Ф	23,9	635,3	21,6
	2941	Ф	20,0	906,9	20,1
					Среднее = 16,2
BHL009	2913	М	31,2	402,6	45,8
	2914	М	31,0	606,7	45,0
	2947	Ф	21,3	724,9	33,2
	2948	Ф	22,3	590,1	22,8
	2949	Ф	20,9	652,8	33,1
					Среднее = 36,0

Фармакодинамика антител против C5 мыши у трансгенных по FcRn человека мышей

Фармакологическую активность антител против C5 мыши в образцах сыворотки оценивали *ex vivo* в анализе опосредованного классическим путем комплемента гемолиза эритроцитов курицы (красных клеток крови курицы; кККК). Гемолитическую активность рассчитывали как процент от активности в образцах до дозирования; она представлена на Фиг. 14–16. Данные для самцов представлены сплошными линиями, для самок – пунктирными линиями. Уровень антагонизма в отношении гемолитической

активности *ex vivo* пропорционален общей концентрации антитела в образце. Гендерное различие для продолжительности антагонистического действия на гемолитическую активность был выражен для BNL011 (Фиг. 14), в соответствии с зависимой от массы тела интерсубъектной изменчивостью среди животных для BNL011 PK (Фиг. 9). В целом интерсубъектная изменчивость среди животных для BNL006 (Фиг. 15) и BNL 009 (Фиг. 16) была незначительной, за исключением самки из получавшей BNL006 когорты (2939), у которой наблюдалось ускоренное выведение антител (Фиг. 10).

Различия корреляции между общей концентрации антитела в сыворотке и антагонизма в отношении гемолитической активности *ex vivo* пропорциональны сродству антитела к C5. Высокоаффинное антитело (BNL011) почти полностью подавляло гемолитическую активность в концентрации ~ 200 мкг/мл (Фиг. 17), тогда как низкоаффинным pH-зависимым антителам против C5 требуются в 2–3 раза более высокие концентрации для обеспечения полного антагонизма *ex vivo* (Фиг. 18 и 19).

Несмотря на указанное снижение эффективности pH-зависимых антител против C5, средние уровни активности гемолиза кККК среди животных из каждой когорты предполагают, что они могут обеспечивать продленный интервал дозирования. На 14 день у получавших лечение высокоаффинными антителами против C5 (BNL011) животных наблюдались средние уровни гемолитической активности $> 40\%$, тогда как у получавших лечение pH-зависимыми антителами против C5 (BNL006 и BNL009) животных средние уровни гемолитической активности по-прежнему составляли $< 40\%$, соответственно, по 21 и 28 день включительно (Фиг. 20).

Значимое увеличение периода полувыведения и соответствующей продолжительности антагонистического действия антител, отличающихся pH-зависимым связыванием с C5 мыши (BNL006 и BNL009) по сравнению с высокоаффинным антителом против C5 мыши (BNL011) согласовывалось с исследованиями, описанными в Примерах 4 и 7, в ходе которых для pH-зависимого антитела против C5 человека (BNJ421, BNJ423 или BNJ441)

наблюдалось аналогичное увеличение периода полувыведения относительно высокоаффинного аналога (ENL000 или экулизумаба) у мышей, которым одновременно вводили C5 человека. Указанные результаты дополнительно подтверждают предположение, что разработанное pH-зависимое связывание антигенов за счет подбора гистидиновых замен в областях CDR может значимо ослаблять антиген-опосредованное выведение за счет C5, обеспечивая возвращение свободного антитела в кровоток. Кроме того, комбинация pH-зависимого связывания антигена и повышенного сродства к FcRn в BNH009 обеспечивало суммарный эффект на фармакокинетические характеристики, удваивая продолжительность периода полувыведения по сравнению с pH-зависимым связыванием по отдельности (BNH006). Указанные наблюдения согласуются с гипотезой о том, что pH-зависимое связывание с C5 в комбинации с повышенным сродством к FcRn может обеспечивать значимое улучшение показателей ФК и продолжительности терапевтической ФД, наблюдаемых для экулизумаба, что дает возможность введения доз ежемесячно или реже.

Пример 7. Получение варианта экулизумаба, отличающегося pH-зависимым связыванием с C5 и усилением FcRn-опосредованного рециклинга

Получали антитело, используя в качестве исходной молекулы экулизумаб. По сравнению с экулизумабом указанный вариант антитела (называемый BNJ441) содержал четыре замены аминокислот в тяжелой цепи, Tyr-27-His, Ser-57-His, Met-429-Leu и Asn-435-Ser (отметим, что положения 429 и 435 BNJ441 соответствуют положениям 428 и 434 в системе нумерации EU). Последовательность аминокислот полипептида тяжелой цепи приведена в последовательности SEQ ID NO:14. Последовательность аминокислот полипептида легкой цепи приведена в последовательности SEQ ID NO:11. Указанные мутации конструировали для обеспечения продленного интервала дозирования BNJ441 (относительно экулизумаба) за счет увеличения периода полувыведения из кровотока посредством двух отдельных механизмов: (1) уменьшения выведения антитела за счет опосредованного мишенью выведения и (2) повышения эффективности

FcRn-опосредованного рециклинга антитела.

Две замены аминокислот в первой и второй определяющей комплементарности области (в областях CDR) вариабельной области тяжелой цепи, Tyr-27-His и Ser-57-His, уменьшают константу диссоциации аффинной связи (K_D) BNJ441 к C5 приблизительно в 17 раз при значении pH 7,4 и приблизительно в 36 раз при значении pH 6,0 относительно экулизумаба. Две мутации в третьем константном домене тяжелой цепи (CH3), Met-429-Leu и Asn-435-Ser, увеличивают сродство BNJ441 к FcRn приблизительно в 10 раз при значении pH 6,0 относительно экулизумаба.

Кинетика связывания (антител с C5)

Кинетику связывания BNJ441 или экулизумаба с C5 определяли посредством поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с помощью инструмента BIAcore 3000 с применением метода захвата Fc при значениях pH 8,0, 7,4, 7,0, 6,5 и 6,0. Поликлональное антитело козы против IgG (Fc) человека (KPL #01-10-20) разбавляли до концентрации 0,1 мг/мл в 10 мМ ацетате натрия с pH 5,0 и иммобилизовали на двух проточных ячейках CM5-чипа в течение 8 минут путем проведения реакции сочетания аминов. Экспериментальное антитело (BNJ441 или экулизумаб) разбавляли до концентрации 0,20 мкг/мл в подвижном буфере (HBS-EP; 0,01 М HEPES с pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЭДТК, 0,005% по объему реагента Surfactant P20; GE Life Sciences, кат. №: BR1001-88). Затем разведенное антитело вводили в одну проточную ячейку (20 мкл для эксперимента с pH 7,4 и 40 мкл для эксперимента с pH 6,0) с последующим введением C5 в варьирующей концентрации в обе ячейки. Подвижный буфер титровали 3М HCl для определения кинетики при pH 7,0, 6,5 и 6,0, и 0,5М NaOH для определения кинетики при pH 8,0. Поверхность регенерировали в каждом цикле 20 мМ HCl, 0,01% P20. Данные обрабатывали в модели Ленгмюра 1:1 с применением программного обеспечения BIAevaluation 4.1 (BIAcore AB, Уппсала, Швеция) с «двойным сравнением».

Скорости диссоциации C5 и BNJ441 или экулизумаба при значениях pH 8,0, 7,4, 7,0, 6,5 и 6,0 определяли посредством ППР с помощью инструмента BIAcore 3000 с применением метода захвата Fc, описанного выше, со следующими модификациями.

Разведенные экспериментальные антитела вводили в одну проточную ячейку с последующим введением 6 нМ C5 в обе ячейки. Непосредственно после введения C5 вводили 250 мкл подвижного буфера с разными значениями pH. Подвижные буферы получали как описано выше. Данные обрабатывали с применением ПО BIAevaluation 4.1 (BIAcore AB, Уппсала, Швеция) с «двойным сравнением». % диссоциации C5 и BNJ441 и экулизумаба вычисляли как разность уровней диссоциации в момент времени $t = 0$ и в момент времени $t = 300$ секунд.

Кинетика связывания (антител с FcRn)

Кинетику связывания BNJ441 или экулизумаба с FcRn человека определяли посредством ППР с помощью инструмента BIAcore 3000 с применением метода захвата $F(ab')_2$ при значениях pH 7,4 и 6,0. Антитело козы против IgG $F(ab')_2$ человека (Rockland Immunochemicals, Кат. №: 709-1118), разведенное до 0,04 мг/мл в 10 mM ацетате натрия pH 5,0, иммобилизовали на двух проточных ячейках CM5-чипа в течение 7 минут путем проведения реакции сочетания аминов. Экспериментальное антитело (BNJ441 или экулизумаб) разбавляли до концентрации 2 мкг/мл в подвижном буфере ((HBS-EP; 0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM ЭДТК, 0,005% по объему реагента Surfactant P20; GE Life Sciences, кат. № BR1001-88). Затем разведенное антитело вводили в одну проточную ячейку с последующим введением FcRn в обе ячейки. Подвижный буфер титровали 3M HCl для определения кинетики при pH 6,0. Поверхность регенерировали в каждом цикле 10 mM глицином-HCl, pH 1,5). Данные обрабатывали в модели Ленгмюра 1:1 с применением программного обеспечения BIAevaluation 4.1 (BIAcore AB, Уппсала, Швеция) с «двойным сравнением».

Результаты исследований связывания

Обнаружено, что кинетика связывания антитела:C5 является pH-зависимой, что оказывает влияние на скорости как связывания, так и диссоциации, приведенные в Таблице 9.

Таблица 9

BNJ441

pH	Скорость связывания: Ka (1/М*с)	Скорость диссоциации: Kd (1/с)	Константа диссоциации: KD (М)	Хи- квадрат
8,0	$6,25 * 10^5$	$1,33 * 10^{-4}$	$2,13 * 10^{-10}$	0,055
7,4	$4,62 * 10^5$	$2,27 * 10^{-4}$	$4,91 * 10^{-10}$	0,045
7,0	$4,28 * 10^5$	$3,90 * 10^{-4}$	$9,11 * 10^{-10}$	0,028
6,5	$4,08 * 10^5$	$8,94 * 10^{-4}$	$2,19 * 10^{-9}$	0,172
6,0	$1,63 * 10^5$	$3,54 * 10^{-3}$	$2,18 * 10^{-8}$	0,373
Экулизумаб				
pH	Скорость связывания: Ka (1/М*с)	Скорость диссоциации: Kd (1/с)	Константа диссоциации: KD (М)	Хи- квадрат
8,0	$1,39 * 10^6$	$2,04 * 10^{-5}$	$1,47 * 10^{-11}$	0,104
7,4	$1,10 * 10^6$	$3,23 * 10^{-5}$	$2,93 * 10^{-11}$	0,094
7,0	$8,86 * 10^5$	$6,34 * 10^{-5}$	$7,15 * 10^{-11}$	0,032
6,5	$8,41 * 10^5$	$1,73 * 10^{-4}$	$2,06 * 10^{-10}$	0,037
6,0	$7,05 * 10^5$	$4,28 * 10^{-4}$	$6,06 * 10^{-10}$	0,092

Для моделирования относительных скоростей диссоциации комплексов антитело:С5 после пиноцитоза и ацидификации в ранней эндосоме обеспечивали формирование комплексов антитело:С5 в буфере с pH 7,4, после чего pH буфера в ходе диссоциации изменяли. Процент диссоциации комплекса с антителом (по оценке на основании уменьшения количества резонансных единиц [RU]) через 300 секунд вычисляли для каждого уровня pH (Таблица 10). Только BNJ441 при значении pH 6,0 обеспечивал более чем 50% диссоциацию комплекса антитело:С5 через 5 минут.

Таблица 10

BNJ441			
pH	RU 0 с	RU 300 с	% диссоциации
8,0	55,4	53,5	3,4
7,4	55,7	52,0	6,6
7,0	55,2	49,1	11,0
6,5	55,2	39,4	28,6
6,0	55,8	22,3	60,0
Экулизумаб			

pH	RU 0 сек	RU 300 сек	% диссоциации
8,0	70,2	69,7	0,8
7,4	70,0	69,5	0,7
7,0	71,3	69,9	2,0
6,5	71,2	67,8	4,7
6,0	71,6	62,9	12,2

На Фиг. 21А и 21В представлены полулогарифмические и линейные графики процента диссоциации комплексов BNJ441:C5 или комплексов экулизумаб:C5 в виде функции pH.

Две замены аминокислот в первой и второй определяющей комплементарность области (в областях CDR) варибельной области тяжелой цепи, Tyr-27-His и Ser-57-His, уменьшают константу диссоциации аффинной связи (K_D) BNJ441 к C5 приблизительно в 17 раз при значении pH 7,4 и приблизительно в 36 раз при значении pH 6,0 относительно экулизумаба. Остается неясным, является ли pH-зависимость сродства BNJ441 к C5 результатом изменений статуса протонирования гистидинов, введенных в положениях 27 и/или 57, или просто общего ослабления сродства к C5. Тем не менее, для других антител против C5 было показано, что указанные мутации в комбинации с дополнительными гистидиновыми заменами обуславливали значительно более выраженное уменьшение аффинности при значениях pH, составляющих менее 6,5. Две мутации в третьем константном домене тяжелой цепи (CH3), Met-429-Leu и Asn-435-Ser, увеличивают сродство BNJ441 к FcRn приблизительно в 10 раз при значении pH 6,0 по сравнению с экулизумабом.

Характеристики ФК антитела BNJ441

ФК антитела BNJ441 и экулизумаба оценивали у мышей с иммунодефицитом (NOD/scid) и мышей, дефицитных по C5. Одну дозу 100 мкг BNJ441 или экулизумаба в 200 мкл забуференного фосфатом солевого раствора (ФСБ) вводили посредством внутривенной (в/в) инъекции каждой из восьми мышей. У каждой мыши брали сыворотку на 1, 3, 7, 14, 21, 28 и 35 день после введения. Концентрацию каждого антитела в сыворотке измеряли с применением ИФА ELISA.

Как показано на Фиг. 22, в отсутствие С5 человека концентрации антитела в сыворотке снижались аналогичным образом у мышей, получивших дозу BNJ441 и дозу экулизумаба на протяжении 35-дневного периода. Однако в присутствии С5 человека концентрации экулизумаба в сыворотке быстро снижались до недетектируемых уровней после 14 дня, тогда как концентрация BNJ441 в сыворотке снижалась медленнее и с постоянной скоростью на протяжении исследования (Фиг. 23).

Сравнение профилей ФК двух указанных антител в присутствии и в отсутствие С5 человека показывает, что выведение экулизумаба ускорялось в присутствии С5 человека по сравнению с выведением в отсутствие С5 человека, тогда как профиль ФК BNJ441 в присутствии С5 человека был аналогичен профилю BNJ441 в отсутствие С5 человека по 28 день включительно, и выведение ускорялось только между 28 и 35 днем (Фиг. 24). Период полувыведения BNJ441 и период полувыведения экулизумаба были сопоставимы в отсутствие С5 человека ($25,37 \pm 1,02$ дней для BNJ441 и $27,65 \pm 2,28$ дня для экулизумаба). Однако в присутствии С5 человека BNJ441 демонстрировал более чем трехкратное увеличение периода полувыведения по сравнению с экулизумабом ($13,40 \pm 2,18$ дней для BNJ441 относительно $3,93 \pm 0,54$ дней для экулизумаба). Следует отметить, что скорость выведения BNJ441 значимо не различалась в присутствии или в отсутствие С5 человека до 28 дня включительно. См. Таблицу 11.

Таблица 11.

Экспериментальная группа	Номер животного	Период полувыведения (дни)
BNJ441	2009	26,99
	2011	25,55
	2212	24,5
	2213	20,34
	2214	27,18
	2215	24,35
	2216	28,65

		Среднее = 25,37
		SE = 1,02
Экулизумаб	2201	30,65
	2202	16,85
	2203	27,02
	2204	28,54
	2205	19,7
	2206	35,47
	2207	33,77
	2208	29,18
		Среднее = 27,65
		SE = 2,28
BNJ441+ C5 человека	2225	24,31
	2226	13,45
	2227	H/O
	2228	13,48
	2229	16,09
	2230	8,55
	2231	11,25
	2232	6,66
		Среднее = 13,40
		SE = 2,18
Экулизумаб + C5 человека	2217	3,35
	2218	2,72
	2219	7,45
	2220	3,26
	2221	2,74
	2222	3,93
	2223	4,5
	2224	3,51
		Среднее = 3,93
		SE = 0,54

Гемолитическая активность в сыворотке

Для определения эффекта гистидиновых замен на

гемолитическую активность антитела выполняли гемолитический анализ *ex vivo*, как описано в Примере 6. В присутствии BNJ441 или экулизумаба активность терминального каскада комплемента согласовывалась с соответствующими ФК-профилями каждого антитела (Фиг. 25) – то есть уровень ингибирования гемолитической активности в сыворотке был пропорционален концентрации каждого остающегося в сыворотке антитела. Оба антитела обеспечивали практически полное ингибирование гемолиза по 3 день включительно. Однако экулизумаб не проявлял антагонистического действия к 14 дню, тогда как BNJ441 к 14 дню по-прежнему обеспечивал ингибирование, составлявшее приблизительно 83%, и частичное ингибирование комплемента по 28 день включительно.

Заклучение

Результаты настоящего исследования показывают, что в присутствии C5 человека наблюдается более чем троекратное увеличение периода полувыведения BNJ441 по сравнению с экулизумабом. Кроме того, период полувыведения BNJ441 из сыворотки относительно экулизумаба обуславливал фармакодинамический профиль с продленным действием, на что указывает пролонгированное ингибирование гемолиза.

Пример 8. Безопасность, переносимость, ФК и ФД BNJ441 у здоровых пациентов-людей

Безопасность, переносимость, ФК и ФД BNJ441 оценивали в ходе фазы I рандомизированного слепого плацебо-контролируемого клинического исследования действия однократных нарастающих доз (SAD) у человека, при этом BNJ441 вводили внутривенно здоровым пациентам.

BNJ441 вводили в состав стерильного не содержащего консервантов водного раствора со вспомогательными веществами. Состав с BNJ441 не содержал каких-либо необычных вспомогательных веществ или вспомогательных веществ, происходящих от человека или животных. Состав забуферивали фосфатом до pH 7,0. Компоненты включали 10 мг/мл BNJ441, 3,34 мМ одноосновный фосфат натрия, 6,63 мМ двуосновный фосфат натрия, 150 мМ хлорид натрия, 0,02% полисорбата 80 и воду в

достаточном количестве.

Состав с BNJ441 предоставлялся в виде раствора антитела в концентрации 10 мг/мл в одноразовом флаконе объемом 20 мл, и предназначался для инфузии после разведения в коммерчески доступном солевом растворе (0,9% хлорид натрия для инъекций, ЕвроФарм) для в/в введения.

Таблица 12

Фаза 1 клинических испытаний на здоровых добровольцах

№ протокола	Название	Дизайн исследования	Популяция	Схема дозирования
BNJ441-HV-101	Фаза 1 рандомизированного слепого плацебо-контролируемого исследования действия однократных нарастающих доз для оценки безопасности, переносимости, ФК и ФД BNJ441 при однократном введении в/в дозы здоровым пациентам	Рандомизированное плацебо-контролируемое двойное слепое исследование первого применения у человека с однократными нарастающими дозами	Здоровые волонтеры	Когорта 1: 200 мг BNJ441 (4: активное вещество, 2: плацебо) Когорта 2: 400 мг BNJ441 (6: активное вещество, 2: плацебо)

Десяти здоровым пациентам вводили одну дозу BNJ441. Четырем пациентам вводили дозу, составляющую 200 мг, и шести пациентам вводили дозу, составляющую 400 мг. В настоящем исследовании оценивали ФК и безопасность; указанные данные обсуждаются ниже.

Фармакокинетика

Профили зависимости концентрации BNJ441 в сыворотке от времени после в/в введения доз 200 мг и 400 мг представлены на Фиг. 26. Данные относительно зависимости концентрации от времени были доступны до 90 дня (2136 часов) и 57 дня (1344 часов), после введения доз 200 мг и 400 мг, соответственно. Среднее значений для концентрации в сыворотке оставалось на уровне, превышающем 50 мкг/мл в течение 2-4 дней (48-96 часов) после введения дозы 200 мг, и в течение 14-21 дня (336-504 часов) после введения дозы 400 мг.

Обзор показателей ФК BNJ441 приведен в Таблице 12 ниже. Геометрическое среднее (CV) $C_{\max}$ для BNJ441 составляло 78,5 (10,2%) мкг/мл после введения дозы 200 мг, и 139 (16,2%) мкг/мл после введения дозы 400 мг. Наблюдаемое медианное время (диапазон) $t_{\max}$ составляло 2,4 (0,79-8,0) часа для дозы 200 мг, и 0,58 (0,58-1,1) часов для дозы 400 мг после начала инфузии. Геометрическое среднее (CV) $AUC_{(0-56 \text{ дней})}$ составляет 32 800 (8,6%) мкг·ч/мл для дозы 200 мг, и 58 100 (18,9%) мкг·ч/мл для дозы 400 мг. Геометрическое среднее $C_{\max}$ и $AUC_{(0-56 \text{ дней})}$ показывают, что экспозиция увеличивалась очевидным дозопропорциональным образом. Геометрическое среднее $t_{1/2}$ (CV) составляет 38,5 (18,4%) дней и 32,9 (13,3%) дней для дозы 200 мг и дозы 400 мг, соответственно.

В общих словах, данные фармакокинетики указывают на то, что значения среднего $C_{\max}$ и $AUC_{(0-56 \text{ дней})}$ для BNJ441 повышались дозопропорциональным образом, и поддерживали значения среднего (стандартное отклонение [SD]) $t_{1/2}$, составляющие $35,5 \pm 6,1$ дней после в/в введения. Анализ данных гемолиза эритроцитов курицы (кККК) указывает на полное ингибирование терминального каскада комплемента до 2 дней после однократного введения в/в дозы 400 мг, в тех случаях, когда концентрации BNJ441 превышали 100 мкг/мл.

Таблица 12

Обзор параметров фармакокинетики BNJ441 после в/в введения 200 мг или 400 мг здоровым добровольцам

Доза (мг)	Описательная статистика	C_{max} (мкг/мл)	$C_{max}/\text{Доза}$ (мкг/мл/мг)	t_{max} (ч)	$AUC\tau^a$ (ч*мкг/мл)	$AUC\tau/\text{Доза}$ ((ч*мкг/мл) /мг)	$t_{1/2}$ (дни)
200	N	4	4	4	4	4	4
	Геометрическое среднее	78,5	0,392	2,40 ^b	32,800	164	38,5
	Коэффициент вариации (CV%) геометрического среднего	10,2	10,2	0,79–8,0 ^c	8,6	8,6	18,4
400	N	6	6	6	6	6	6
	Геометрическое среднее	139	0,348	0,58 ^b	58,100	145	32,9
	CV% геометрического среднего	16,2	16,2	0,58–1,1 ^c	18,9	18,9	13,3

^a $AUC\tau = AUC_{(0-56 \text{ дней})}$

^b медиана

^c диапазон

Фармакодинамика

Также оценивали способность BNJ441 ингибировать гемолиз кККК с течением времени, как показано на Фиг. 27. Среднее значение активности гемолиза кККК было относительно стабильным у пациентов, получавших плацебо. Ингибирование гемолиза кККК начиналось быстро, а полное ингибирование терминального каскада комплемента наблюдалось в конце инфузии (0,29 часов для дозы 200 мг, и 0,58 часов для дозы 400 мг). BNJ441 отличался дозозависимой длительностью действия, продолжавшегося от 4 до 14 дней.

Строили графики зависимости между концентрацией BNJ441 и гемолизом кККК, приведенные на Фиг. 28. Как показано на Фиг. 28, полное ингибирование терминального каскада комплемента происходило при концентрациях BNJ441, превышающих 50 мкг/мл, при отсутствии ингибирования для концентраций BNJ441 ниже 25 мкг/мл.

Пример 9. Одноразовое исследование на яванских макаках

Однократную в/в дозу BNJ441 вводили яванским макакам в дозировке 60 или 150 мг/кг (n = 4 для каждой дозовой группы; по 2 самца и 2 самки на дозовую группу) в виде 2-часовой инфузии. Образцы крови для анализа BNJ441 собирали с 1 по 112 день.

У всех получавших лечение BNJ441 обезьян проводился скрининг присутствия антител яванского макака против человека (СНА) до дозирования (0 ч) и на 8, 14, 28, 56, 84 и 112 дни.

Для всех обезьян в дозовых группах, получавших 60 и 150 мг/кг, положительный результат подтверждался по меньшей мере один раз, за исключением животного 2002 в дозовой группе, получавшей 150 мг/кг. Нельзя исключить присутствие СНА у животного 2002 или у других животных в моменты времени, для которых не были получены положительные результаты, ввиду вероятного взаимодействия введенного BNJ441 в анализе с мостикообразующим биотинилированным BNJ441 и рутенилированным BNJ441. Положительные по СНА результаты наблюдались в дозовой группе, получавшей 60 мг/кг, с 56 по 112 день после дозирования, и в дозовой группе, получавшей 150 мг/кг, с 28 по 112 день после дозирования. Первый образец с подтвержденным

САНА-положительным результатом в группе, получавшей 60 мг/кг, был получен на 56 день (животные 1002 и 1503), 2-й на 84 день (животные 1002 и 1503) и 3-й на 112 день (животные 1001, 1002 и 1502). Животное 1503, САНА-положительное на 56 и 84 день, на 112 день уже не показало САНА-положительных результатов. Первый образец с подтвержденным САНА-положительным результатом в дозовой группе, получавшей 150 мг/кг, был получен от животного 2502 на 28 день, с последующими 2 образцами на 56 день (животные 2001 и 2502), 3 образцами на 84 день (животные 2001, 2501 и 2502) и 3 образцами на 112 день (животные 2001, 2501 и 2502).

Рассчитывали индивидуальные профили зависимости концентрации BNJ441 от времени. В дозовой группе, получавшей 60 мг/кг, у всех обезьян наблюдались количественно определяемые концентрации BNJ441 в плазме в образцах для ФК до 112 дня включительно, тогда как в дозовой группе, получавшей 150 мг/кг, только у одной обезьяны (животное 2002) наблюдались количественно определяемые концентрации BNJ441 в плазме по 112 день включительно. Данные относительно зависимости концентрации от времени указывают на пролонгированное присутствие BNJ441 в системном кровотоке обезьян.

Вычисляли некомпартментные показатели ФК и сводные статистические данные для BNJ441 для всех обезьян по уровню дозы; указанные данные приведены в Таблицах 13 и 14 для уровней дозы 60 мг/кг и 150 мг/кг, соответственно. В соответствии с продолжительностью инфузии, медиана $t_{\max}$ составляла 2 часа для уровней дозы 60 мг/кг и 150 мг/кг. У одной обезьяны в дозовой группе, получавшей 150 мг/кг, животного 2501, наблюдался период $t_{\max}$, составлявший 12 часов после дозирования, и относительно плоский профиль с 2 по 12 часов после дозирования, при этом концентрация в образце, полученной через 12 часов после дозирования, приблизительно на 5% выше наблюдавшейся через 2 часа после дозирования концентрации. Геометрическое среднее как $C_{\max}$, так и AUC_{∞} и AUC_{last} повышалось при увеличении дозы. Геометрическое среднее нормированных по дозе значений $C_{\max}$ было аналогичным для 2 доз, что указывает на дозопропорциональное

увеличение пиковой концентрации BNJ441 при повышении дозы, однако геометрическое среднее нормированных по дозе значений AUC_∞ различалось в разных дозовых группах. Указанное различие предположительно обусловлено САНА-опосредованным повышением скорости выведения BNJ441 (CL) в дозовой группе, получавшей 150 мг/кг; выведение BNJ441 усиливалось приблизительно на 37% у обезьян, получавших дозу 150 мг/кг по сравнению с обезьянами, получавшими дозу 60 мг/кг. Значения геометрического среднего V_{ss} были аналогичными (в пределах 12%) в указанных 2-х дозовых группах.

Таблица 13

Обзор некомпартментных параметров фармакокинетики BNJ441 (Доза 60 мг/кг)

Животное	Доза (мг/кг)	C _{max} (мг/мл)	C _{max} / Доза ¹⁾	t _{max} (ч)	AUC _{last} (ч × мг/мл)	AUC _∞ (ч × мг/мл)	AUC _∞ / Доза ²⁾	V _{ss} (мл/кг)	CL (мл/ч/кг)	t _{1/2} (ч)	t _{1/2} (день)
1001	60	1,92	0,0320	2,0	546	555	9,25	63,4	0,108	479	20,0
1002	60	1,90	0,0317	2,0	470	475	7,92	55,3	0,126	474	19,8
1502	60	1,45	0,0242	2,0	598	614	10,2	64,9	0,0977	547	22,8
1503	60	1,44	0,0240	2,0	701	745	12,4	73,7	0,0806	649	27,1
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Среднее	1,68	0,0280	2,00	579	597	9,95	64,3	0,103	537	22,4
	SD	0,269	0,00448	Н.П.	97,0	113	1,89	7,53	0,0191	81,7	3,40
	Минимум	1,44	0,0240	2,00	470	475	7,92	55,3	0,0806	474	19,8
	Медиана	1,68	0,0279	2,00	572	585	9,74	64,2	0,103	513	21,4
	Максимум	1,92	0,0320	2,00	701	745	12,4	73,7	0,126	649	27,1
	CV%	16,0	16,0	Н.П.	16,8	19,0	19,0	11,7	18,5	15,2	15,2
	Геометрическое среднее	1,66	0,0277	Н.П.	573	589	9,82	64,0	0,102	533	22,2
	CV% геометрического среднего	16,2	16,2	Н.П.	16,9	19,0	19,0	11,8	19,0	14,8	14,8

¹⁾ Единицы: мг/мл/мг/кг²⁾ Единицы: ч × мг/мл/мг/кг

ч = час; Н.П. = неприменимо;

Таблица 14

Обзор некомпартментных параметров фармакокинетики BNJ441 (Доза 150 мг/кг)

Животное	Доза (мг/кг)	C _{max} (мг/мл)	C _{max} / Доза ¹⁾	t _{max} (ч)	AUC _{last} (ч × мг/мл)	AUC _∞ (ч × мг/мл)	AUC _∞ / Доза ²⁾	V _{ss} (мл/кг)	CL (мл/ч/кг)	t _{1/2} (ч)	t _{1/2} (день)
2001	150	3,79	0,0253	2,0	787	787	5,25	52,6	0,191	61,0	2,54
2002	150	4,51	0,0301	2,0	1160	1220	8,15	89,8	0,123	759	31,6
2501	150	4,48	0,0299	12,0	1460	1460	9,71	58,8	0,103	87,6	3,65
2502	150	4,40	0,0293	2,0	1030	1030	6,86	37,5	0,146	54,1	2,25
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Среднее	4,30	0,0286	4,50	1110	1120	7,49	59,7	0,141	240	10,0
	SD	0,340	0,00227	Н.П.	279	285	1,90	22,0	0,0377	346	14,4
	Минимум	3,79	0,0253	2,00	787	787	5,25	37,5	0,103	54,1	2,25
	Медиана	4,44	0,0296	2,00	1100	1130	7,50	55,7	0,134	74,3	3,09
	Максимум	4,51	0,0301	12,0	1460	1460	9,71	89,8	0,191	759	31,6
	CV%	7,91	7,91	Н.П.	25,2	25,3	25,3	36,9	26,8	144	144
	Геометрическое среднее	4,28	0,0286	Н.П.	1080	1100	7,30	56,8	0,137	122	5,07
	CV% геометрического среднего	8,25	8,25	Н.П.	26,1	26,7	26,7	37,2	26,7	190	190

¹⁾ Единицы: мг/мл/мг/кг²⁾ Ошибка! Источник ссылки не найден. Единицы: ч × мг/мл/мг/кг

ч = час; Н.П. = неприменимо

Пример 10. Сравнительная оценка связывания BNJ441, экулизумаба и h5G1.1 с рецепторами Fc-гамма C1q *in vitro*

Исследовали связывание трех гуманизированных антител, BNJ441, экулизумаба и h5G1.1-IgG1 с молекулами, которые, как известно, опосредуют эффекторную функцию антитела. И BNJ441, и экулизумаб, и h5G1.1-IgG1 отличаются уникальными функциональными и терапевтическими профилями. При этом все три антитела представляют собой гуманизированные антитела-антагонисты терминального каскада комплемента, связывающие очень сходные эпитопы на компоненте комплемента C5 человека и предотвращающие его расщепление во время активации комплемента на активные метаболиты C5a и C5b.

Последовательности легких цепей BNJ441, экулизумаба и h5G1.1-IgG1 идентичны, каждая из них содержит гуманизированную переменную область и константную область каппа-цепи Ig человека. И BNJ441, и экулизумаб содержат гибридный Fc IgG2-G4 человека, который включает область CH1, шарнир и первые 29 аминокислот области CH2 IgG2 человека, соединенные с остатками областей CH2 и CH3 IgG4 человека. В указанной гибридной Fc сочетается стабильная дисульфидная связь IgG2 с менее выраженной эффекторной функцией IgG4. Поскольку BNJ441 и экулизумаб направлены против растворимого антигена, не представлялось возможным непосредственно оценить их способность инициировать антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗКЦ) или комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ). Вместо этого проводили непосредственное измерение связывания BNJ441 или экулизумаба с рецепторами Fc-гамма (FcγR) и компонентов комплемента C1q; был сделан вывод, что в отсутствие связывания они неспособны опосредовать АЗКЦ или КЗЦ, соответственно. В качестве контроля включали h5G1.1-IgG1 (антитело изотипа IgG1, содержащее ту же гуманизированную переменную область, что и экулизумаб). Ожидается, что Fc-область изотипа IgG1 полностью связывает обладающие эффекторной функцией молекулы, хотя сама по себе h5G1.1-IgG1 не вызывает АЗКЦ или КЗЦ в отсутствие связанного с клетками антигена.

Как обсуждалось выше в Примере 7, BNJ441 конструировали из экулизумаба для увеличения периода полувыведения *in vivo* путем введения 4 замен аминокислот в тяжелую цепь. Два изменения аминокислот в гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи, Tyr-27-His и Ser-57-His, соответственно (нумерация аминокислот тяжелой цепи соответствует Kabat et al.), вводили для дестабилизации связывания с C5 при значении pH 6,0 с минимальным влиянием на связывание с C5 при значении pH 7,4. Мутации в третьем домене константной области тяжелой цепи (CH3), Met-428-Leu и Asn-434-Ser, вводили для усиления связывания с неонатальным Fc-рецептором человека (FcRn). В совокупности указанные мутации предназначались для значимого уменьшения антиген-опосредованного выведения лекарственного средства за счет повышения диссоциации комплексов антитело:C5 на свободное антитело в кислой среде ранней эндосомы после пиноцитоза, и для увеличения доли антитела, рециклирующего из ранней эндосомы, в сосудистый компартмент через FcRn.

В настоящих исследованиях оценивали мультимерные взаимодействия подклассов FcγR (FcγR1, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIb/c, FcγRIIIa и FcγRIIIb) со всеми тремя антителами с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA); мономерные взаимодействия с FcγR оценивали с применением поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Биослойную интерферометрию и ППР использовали для исследования связывания C1q с указанными тремя антителами. Реагенты, использованные для проведения указанных анализов, представлены в Таблице 15.

Таблица 15.

Антитела и белковые реагенты

Реагент	Источник	Концентрация
BNJ441	Alexion	10 мг/мл
Экулизумаб	Alexion	10 мг/мл
Меченое биотином антитело козы против человека F(ab') ₂	Jackson Immunolabs	1,1 мг/мл
HRP-стрептавидин	Invitrogen	1,25 мг/мл

h5G1.1-IgG1	Alexion	1,43 мкг/мл 8,11 мкг/мл
C1q	Complement Technology	1 мкг/мл
FcγRI Человека (CD64)	R&D systems	100 мкг/мл
FcγRIIa Человека (CD32a)	R&D systems	100 мкг/мл
FcγRIIb/c Человека (CD32b/c)	R&D systems	100 мкг/мл
FcγRIIIa Человека (CD16a)	R&D systems	100 мкг/мл
FcγRIIIb Человека (CD16b)	R&D systems	100 мкг/мл

Связывание комплексов мультивалентных антител с рецепторами FcγR

Комплексы с антителом получали путем инкубирования BNJ441, экулизумаба или h5G1.1-hG1 в течение ночи с меченым биотином антителом козы против F(ab')₂ человека (Jackson Immunolabs) в молярном отношении антитело:F(ab')₂, равном 2:1, в забуференном фосфатом солевом растворе (ФСБ) в микроцентрифужной пробирке объемом 1,5 мл.

Микротитрационные планшеты, предварительно покрытые Ni-NTA (Qiagen), инкубировали с мечеными 6X-гистидином рецепторами FcγR человека (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb/c, FcγRIIIa или FcγRIIIb) в концентрации 5 мкг/мл в ФСБ и объеме 50 мкл/лунку, в течение ночи при 4°C. Затем планшет троекратно промывали ФСБ/0,05% Tween-20. После промывания 50 мкл комплексов с антителом в ФСБ/0,05% Tween-20 инкубировали в планшете в течение 60 минут при комнатной температуре (КТ). После промывания планшета ФСБ/0,05% Tween-20 добавляли 50 мкл стрептавидина-HRP (пероксидазы хрена) (Invitrogen) в ФСБ/0,05% Tween-20 и инкубировали в течение 60 минут при КТ. После указанного инкубирования и промывания добавляли 75 мкл ТМВ-субстрата для ИФА ELISA (3, 3', 5, 5'-тетраметилбензидин, Thermo Scientific). Реакцию останавливали добавлением 75 мкл 2 М H₂SO₄, и считывали

поглощение при 450 нм.

Образцы анализировали в двух повторностях; данные представлены в виде значений среднего. Результаты вводили в редактор таблиц. Поглощение при 450 нм для каждой концентрации иммунного комплекса с антителом или в отсутствие иммунного комплекса с антителом представляли в виде графика. Вычисляли ключевые константы диссоциации, обобщенные в Таблице 16 и обсуждаемые ниже.

Связывание моновалентных антител с FcγR

Кинетику связывания BNJ441, экулизумаба и h5G1.1-IgG с FcγR определяли с помощью ППР с помощью инструмента BIAcore 3000 с применением прямой иммобилизации. BNJ441, экулизумаб и h5G1.1 разводили в 10 мМ ацетате натрия pH 5,0, иммобилизовали в одной проточной ячейке CM5-чипа путем проведения реакции сочетания аминов. Вторую проточную ячейку использовали в качестве эталонной поверхности. Разведения рецепторов FcγR в подвижном буфере (HBS-EP, pH 7,4) вводили в обе ячейки. Поверхность регенерировали в каждом цикле 20 мМ HCl, 0,01% P20. Данные анализировали с применением равновесной аффинной модели в ПО BIAevaluation 4.1 (BIAcore AB, Уппсала, Швеция) с «двойным сравнением».

Кинетику связывания h5G1.1-IgG1 с FcγRI оценивали по одному циклу ввиду более высокого сродства. Антитело разводили в 10 мМ ацетате натрия с pH 5,0 и непосредственно иммобилизовали в одной проточной ячейке CM5-чипа путем проведения реакции сочетания аминов. Вторую проточную ячейку использовали в качестве эталонной поверхности. Разведения FcγR1 в подвижном буфере (HBS-EP, pH 7,4) вводили в обе ячейки. Регенерация при проведении указанного анализа не требовалась. Данные анализировали с применением титрационной кинетической модели 1:1 в ПО BIAevaluation 4.1 (Biacore AB, Уппсала, Швеция) с «двойным сравнением».

Таблица 16

Константы диссоциации связи BNJ441, экулизумаба и h5G1.1-IgG1 с мономерными FcγR

FcγR	BNJ441, K _D [мкМ]	Экулизумаб, K _D [мкМ]	h5G1.1-IgG1, K _D [мкМ]
RI	3,75	3,78	0,123
RIIa	2,31	2,58	0,8
RIIb/c	8,09	9,84	3,06
RIIIa	7,23	6,78	0,85
RIIIb	3,33	3,49	1,89

Проводили ИФА ELISA для детекции обусловленных авидностью мультимерных взаимодействий иммунных комплексов антитела и FcγR. Результаты обобщены в Таблице 16. BNJ441 и экулизумаб не демонстрировали детектируемого связывания с FcγRI, FcγRIIb/c, FcγRIIIa или FcγRIIIb, и демонстрировали в 4-8 раз более слабое связывание с FcγRIIa, соответственно. Константы диссоциации (K_D) связи с мономерным FcγR BNJ441 и экулизумаба, полученные с применением ППР, подтверждают, что взаимодействия с FcγR очень незначительны и практически неразличимы для двух антител: FcγRI (~ 4 мкМ), FcγRIIa (~ 2 мкМ), FcγRIIb (~ 9 мкМ), FcγRIIIa (~ 7 мкМ) и FcγRIIIb (~ 3 мкМ). Константы диссоциации для контроля изотипа IgG1 (h5G1.1-IgG1) согласовывались с высокоаффинными взаимодействиями с FcγR1 (123 пМ) и умеренным увеличением связывания с низкоаффинными FcγR относительно антител изотипа IgG2-G4: FcγRIIa (~ 1 мкМ), FcγRIIb (~ 3 мкМ), FcγRIIIa (~ 1 мкМ) и FcγRIIIb (~ 2 мкМ). См. Таблицу 16. С помощью биослойной интерферометрии взаимодействия между C1q и BNJ441 или экулизумабом не детектировались. Указанные результаты согласуются с идеей о том, что гибрид Fc IgG2-G4 человека с экулизумабом не способен или в незначительной степени способен стимулировать эффекторную функцию через FcγR или C1q, опосредуя АЗКЦ или КЗЦ, соответственно. Далее, указанные результаты показывают, что замены аминокислот тяжелой цепи, введенные в

BNJ441, значимо не влияют на связывание с ними по сравнению с экулизумабом.

Пример 11. Исследования перекрестной реактивности в тканях

GLP-исследования перекрестной реактивности у человека

Потенциальную перекрестную реактивность в тканях человека определяли с применением меченых флуоресцином BNJ441 (обозначаемых BNJ441-ФИТЦ) и контрольного антитела (OX-90G2G4-ФИТЦ) с разной антигенной специфичностью.

BNJ441-ФИТЦ обеспечивал окрашивание материала положительного контроля (спот-слайды в активируемой ультрафиолетом [УФ] смоле очищенного белка компонента человека C5, называемого hC5) от умеренного до интенсивного, но не вступал в специфическую реакцию с материалом отрицательного контроля (пептид гиперкальциемии злокачественности человека, остатки аминокислот 1-34, называемый PTHrP 1-34, спот-слайды в УФ-смоле). Контрольное вещество, OX-90G2G4-ФИТЦ, не вступало в специфическую реакцию ни с материалом положительного, ни с материалом отрицательного контроля. Ярковыраженные специфические реакции BNJ441-ФИТЦ с материалом положительного контроля материал и отсутствие специфической реакционности в отношении материала отрицательного контроля, а также отсутствие специфической реакционности в отношении контрольного вещества указывают на чувствительность, специфичность и воспроизводимость данного анализа.

Окрашивание BNJ441-ФИТЦ наблюдалось в выборке тканей человека, кратко описанной ниже:

Белковый материал в большинстве тканей человека

Цитоплазма и / или цитоплазматические гранулы в следующих тканевых элементах:

Мононуклеарные клетки толстой кишки, пищевода, лимфатических узлов, парашитовидной железы, селезенки и миндалин

Тромбоциты в мазках крови и костном мозге

Мегакариоциты в костном мозге

Эпителий фаллопиевой трубы, печени (гепатоцитах),

панкреатических протоков и шейки матки

мезотелий легких

Поскольку C5 представляет собой циркулирующий белок сыворотки, ожидалось окрашивание белкового материала. Была описана секреция C5 мононуклеарными клетками, такими как моноциты, макрофаги и дендритные клетки, а также тромбоциты; соответственно, также ожидалось окрашивание клеток указанных типов BNJ441-ФИТЦ. Кроме того, линии мезотелиальных клеток, как было показано, продуцируют C5. Однако в литературных источниках не было обнаружено описания экспрессии C5 эпителиальными типами клеток, окрашивающимися BNJ441-ФИТЦ в настоящем исследовании, или мегакариоцитов, хотя тромбоциты, которые, как было показано, продуцируют C5, образуются из мегакариоцитов. Соответственно, окрашивание эпителиальных типов клеток может означать наличие либо ранее неизвестных участков экспрессии C5, либо перекрестной реактивности в тканях с белковой последовательностью или структурой аналогичного, но неродственного белка или другим(и) компонентом(ами) тканевых срезов. Как бы то ни было, за исключением окрашивания белкового материала, все наблюдавшееся в данном исследовании окрашивание было цитоплазматическим, и маловероятно, что цитоплазма и цитоплазматические структуры были бы доступны для экспериментального вещества *in vivo*. В целом, при окрашивании BNJ441-ФИТЦ не наблюдалось специфическая перекрестная реактивность, которая позволила бы предполагать наличие связанной с лечением токсичности.

GLP-исследование перекрестной реактивности в тканях яванского макака

Стандартное GLP-исследование перекрестной реактивности в тканях также проводили с применением выборки тканей яванского макака для изучения нецелевого и целевого связывания, с применением тех же реагентов, что и для исследования связывания в тканях человека.

Некоторое окрашивание BNJ441-ФИТЦ наблюдалось в выборке тканей яванского макака, кратко описанной ниже:

Белковый материал в большинстве тканей яванского макака

Цитоплазма и / или цитоплазматические гранулы в следующих тканевых элементах:

мононуклеарные клетки в лимфатических узлах, селезенке и миндалинах

эпителий фаллопиевой трубы

Паттерн окрашивания BNJ441-ФИТЦ, наблюдаемый в выборке тканей яванского макака, в целом отличался меньшей интенсивностью и меньшей частотой, чем наблюдаемый в выборке тканей человека в связанном исследовании перекрестной реактивности в тканях человека. Кроме того, в выборке тканей человека наблюдалось окрашивание тромбоцитов, мегакариоцитов, эпителия протоков поджелудочной железы, эпителия шейки матки, гепатоцитов и мезотелия, хотя указанные тканевые элементы не окрашивались в выборке тканей яванского макака. Кроме того, за исключением окрашивания белкового материала, наблюдавшееся в данном исследовании окрашивание было цитоплазматическим, и маловероятно, что цитоплазма и цитоплазматические структуры были бы доступны для экспериментального вещества *in vivo*. Поскольку было показано, что BNJ441 отличается исключительной специфичностью в отношении C5 человека (и не проявляет перекрестную реакционную способность в отношении C5 не являющихся человеком приматов), ограниченное связывание, наблюдаемое в данном исследовании, предположительно происходило за счет неспецифического связывания с неидентифицированным перекрестно-реактивным материалом.

Пример 12: Эффективность BNJ441 по сравнению с экулизумабом в анализах активности терминального каскада комплемента

Сконструированные для обеспечения pH-зависимого связывания с C5 мутации BNJ441 ослабляют его аффинность при значении pH 7,4 (приблизительно 491 пМ) примерно в 17 раз относительно экулизумаба (приблизительно 29,3 пМ), и можно было бы ожидать, что они будут уменьшать эффективность BNJ441 для ингибирования опосредованной C5 активности терминального каскада комплемента по сравнению с экулизумабом. Для оценки эффективности BNJ441 и экулизумаба в подходящих физиологических условиях оценивали

антагонизм в отношении опосредованного комплементом гемолиза эритроцитов (ККК) в 3 часто используемых моделях на животных (курица, овца и кролик) в 90% нормальной сыворотке человека.

ККК и эритроциты овцы (оККК) пресенсибилизовали антителами, чтобы инициировать классический путь активации комплемента (КПК). Эритроциты кролика (крККК) не пресенсибилизовали и использовали для моделирования альтернативного пути активации комплемента (АПК). Антитела предварительно инкубировали в сыворотке в концентрации 100, 200 и 400 нМ для получения молярных отношений антигенсвязывающих сайтов и C5, составляющих приблизительно 0,5:1, 1:1 и 2:1, соответственно. Антитело BNJ430 содержит такую же Fc-область, что и BNJ441, однако не связывает C5 человека; его использовали в качестве отрицательного контроля. Процент гемолиза измеряли через 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 8 минут для подтверждения протекания реакций в условиях начальной скорости.

Как видно на Фиг. 29, ни BNJ441, ни экулизумаб не оказывали антагонистического действия в концентрации 100 нМ при гемолизе кККК. Оба антитела проявляли частичный антагонизм в концентрации 200 нМ (молярное отношение антигенсвязывающих сайтов к C5, составляющее приблизительно 1:1), причем эффективность BNJ441 была меньше эффективности экулизумаба. Почти полное ингибирование гемолиза обоими антителами происходило в случае инкубирования при молярном отношении антигенсвязывающих сайтов к C5, составляющем 2:1 (400 нМ). Результаты гемолитических анализов для оККК были аналогичными, с наблюдавшимся менее чем 20% гемолизом в присутствии BNJ441 в концентрации 200 нМ, и почти полным ингибированием обоими антителами в концентрации 400 нМ (данные не показаны). В анализах АПК-опосредованного гемолиза крККК наблюдаются более высокие уровни гемолиза в присутствии антител против C5, при отсутствии детектируемого ингибирования для концентраций, составляющих 200 нМ, и только частичное ингибирование для концентраций, составляющих 400 нМ (данные не показаны).

В заключение отметим, что умеренное снижение эффективности BNJ441 по сравнению с экулизумабом в указанных анализах

активности комплемента *in vitro* согласуется со свойственным ему меньшим сродством к C5. Тем не менее, сродство BNJ441 к C5 соответствует концентрациям, приблизительно в 1000 раз меньшим, чем концентрации C5 *in vivo* и целевые терапевтические уровни BNJ441, и, соответственно, маловероятно, что это будет препятствовать его терапевтической эффективности.

Пример 13: Селективность BNJ441 по сравнению с экулизумабом в анализе активности терминального каскада комплемента

Для оценки фармакологической активности BNJ441 в моделях на не являющихся человеком животных измеряли способность BNJ441 антагонистически действовать на комплемент-опосредованный гемолиз сенсibilизированных антителами кККК в сыворотке шимпанзе, павиана, макака-резусов, яванского макака, бигля, кролика, морской свинки, крысы и мыши. Экулизумаб и антитело против C5 мыши с Fc IgG2/G4 человека (BNJ430) использовали в качестве контрольных изотипов.

Для каждого анализа получали сенсibilизированные кККК из 400 мкл цельной крови курицы в растворе Альсевера (Lampire Biologicals), 4-кратно промывали 1 мл GVBS при 4°C и ресуспендировали в GVBS с плотностью 5×10^7 клеток/мл. Для сенсibilизации эритроцитов курицы в клетки добавляли поликлональное антитело против эритроцитов курицы (Rockland) в концентрации 150 мкг/мл и инкубировали в течение 15 минут на льду. После однократного промывания GVBS клетки ресуспендировали в GVBS до конечного объема 3,6 мл.

Сыворотки с функциональным комплементом, в том числе сыворотку следующих млекопитающих: человека; шимпанзе; павиана; макака-резус; яванского макака; бигля; кролика; морской свинки; и крысы получали от Bioreclamation. Антитела BNJ441 в концентрации 10 мг/мл; экулизумаб (10 мг/мл); BNJ430 в концентрации 0,873 мг/мл разводили до конечной концентрации 0, 60, 300 и 600 нМ в 30% сыворотке в GVBS и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Сенсibilизированные кККК добавляли в смесь антитело/сыворотка в объеме 30 мкл на

лунку ($2,5 \times 10^6$ клеток), инкубировали при 37°C в течение 30 минут и останавливали реакции добавлением 30 мкл 0,5М ЭДТК в каждую лунку. Планшеты центрифугировали при $1800 \times g$ в течение 3 минут и 80 мкл супернатанта переносили в новый плоскодонный 96-луночный планшет. Поглощение измеряли при 415 нм.

Поскольку сыворотка мыши представляет собой неудовлетворительный источник активности классического пути комплемента, сыворотку мыши смешивали 1:1 с истощенной по C5 сывороткой человека для оценки потенциальной фармакологической активности BNJ441 у мышей. Антитела разводили до конечной концентрации 0, 60, 300 и 600 нМ в 50% объединенной сыворотке (25% сыворотки мыши, 25% истощенной по C5 сыворотки человека) в GVBS и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Сенсибилизированные кККК добавляли в смесь антитело/сыворотка в объеме 30 мкл на лунку ($2,5 \times 10^6$ клеток), инкубировали при 37°C в течение 30 минут и реакции останавливали добавлением 30 мкл 0,5М ЭДТК в каждую лунку. Планшеты центрифугировали при $1800 \times g$ в течение 3 минут и 80 мкл супернатанта переносили в новый плоскодонный 96-луночный планшет. Поглощение измеряли при 415 нм.

Образцы, содержащие сыворотку без антител против C5 с 10 мМ ЭДТК или без ЭДТК использовали в качестве контролей без лизиса или с полным лизисом, соответственно. Образцы с заданными показателями использовались в трех или двух повторностях.

Результаты вводили в редактор таблиц для вычитания фона на основе контрольных образцов без лизиса и нормирования процента гемолиза по контрольным образцам с полным лизисом, вычисления значений среднего ($\pm$ s.d.) и графического представления данных. Показатели поглощения для значения среднего фона в контрольных образцах без лизиса вычитали из показателей каждого повторного образца и выражали поглощение в образцах как процент от лизиса в контрольных образцах с полным лизисом в соответствии со следующим уравнением: % гемолиза кККК = (значение A415 в каждом повторном образце - среднее значение A415 для контроля без

лизиса) / (среднее значение A415 для контроля с полным лизисом - среднее значение A415 для контроля без лизиса)×100.

Строили графики значений среднего со стандартным отклонением для % гемолиза кККК в повторностях образцов (данные не показаны).

Было показано, что BNJ441 детектируемо не связывается с природным C5 яванского макака и не проявляет фармакологической активности *in vitro* ни в одной из не принадлежащих человеку сывороток при тестировании 8-кратного молярного избытка антигенсвязывающих сайтов относительно C5. В совокупности указанные данные согласуются с выводом о том, что BNJ441 не обладает какой-либо релевантной фармакологической активностью у любых легкодоступных не являющихся человеком видов, подходящих для моделирования фармакокинетики или фармакодинамики у человека.

Пример 14: Физико-химические характеристики BNJ441

Антитело BNJ441 представляет собой рекомбинантное гуманизированное антитело, и состоит из двух идентичных тяжелых цепей длиной 448 аминокислот и двух идентичных легких цепей длиной 214 аминокислот. См. Фиг. 30. Константные области BNJ441 включают константную область легкой каппа-цепи человека и гибридную константную область тяжелой цепи IgG2-IgG4 человека (также называемую «G2/G4»). Константная область IgG2/G4 была получена путем рационального дизайна для ослабления активации эффекторной функции, активации комплемента и иммуногенности антитела. Домен CH1 тяжелой цепи, шарнирная область и первые 5 аминокислот домена CH2 соответствуют последовательности аминокислот IgG2 человека, остаткам 6-36 области CH2, и совпадают в последовательности аминокислот и IgG2, и IgG4 человека, тогда как остальная часть домена CH2 и домен CH3 соответствуют последовательности аминокислот IgG4 человека. Вариабельные области тяжелых и легких цепей, образующие сайт связывания C5 человека, состоят из каркасных областей человека, привитых на определяющие комплементарность области мыши. Межцепочечные дисульфидные связи в антителе BNJ441 изображены

на Фиг. 31. Номера остатков для всех дисульфидных связей и участков присоединения N-связанных гликанов приведены на Фиг. 31.

В Таблице 17 представлены основные свойства антитела BNJ441. Приведенные ниже теоретическая химическая формула и теоретическая средняя молекулярная масса главного компонента предполагают, что указанное антитело отличается наличием 18 дисульфидных связей, двух N-концевых пироглутаматов на тяжелой цепи, удалением двух C-концевых лизинов тяжелой цепи и добавлением двух остатков G0F-гликана. количество остатков аминокислот в BNJ441 было предсказано на основании анализа аминокислот.

Таблица 17

Основные характеристики антитела BNJ441

Характеристика	Значение
Теоретическая химическая формула	C ₆₅₄₂ H ₁₀₀₇₂ N ₁₇₀₄ O ₂₁₀₆ S ₄₈
Теоретическая средняя молекулярная масса	147 827,62 Да
Число аминокислот	1324

Для получения BNJ441 разрабатывали линию клеток китайского хомячка (CHO), экспрессирующую BNJ441. Исходные клетки CHOK1SV, используемые для получения указанной клеточной линии, получали из главного клеточного банка Lonza Biologics CHOK1SV 269-M. Указанный источник клеток проверяли на отсутствие бактериальных и грибных загрязняющих примесей и любых детектируемых вирусов, не являющихся неинфекционными клеточными эндогенными ретровирусными частицами. Клетки-хозяева CHOK1SV трансфицировали плазмидой pBNJ441.1; стабильные клоны выбирали с применением MSX. Первичный клон 3A5 выбирали в качестве клеточной линии-продуцента BNJ441.

Получали технические серии и GMP-серии нерасфасованного лекарственного вещества BNJ441 и определяли физико-химические свойства с применением тестов, перечисленных в Таблице 18. Техническую серию получали на опытной установке с использованием клеток CHO, культивированных в биореакторе

объемом 200 л, и очищенный материал использовали для исследования ФК. GMP-серию получали с использованием клеток CHO, культивированных на опытной установке в биореакторе объемом 200 л. Из технической и GMP-серии нерасфасованного лекарственного вещества BNJ441 получали составы и тестировали в концентрации приблизительно 10 мг/мл. Физико-химические свойства указанных серий обобщены в Таблице 19.

Таблица 18

Анализ физико-химических характеристик BNJ441

Вид тестирования	Тест
Чистота	Аналитическое ультрацентрифугирование
Размер	Анализ молекулярной массы интактного вещества (времяпролетная МАЛДИ масс-спектрометрия (МАЛДИ-ВП-МС))
Размер	Анализ молекулярной массы интактного вещества (времяпролетная масс-спектрометрия с ионизацией электроспреем (ЭСИ-ВП-МС))
Идентификация	N-концевое секвенирование
Первичная структура	Аминокислотный анализ
Структура более высокого порядка	Спектрометрия кругового дихроизма
Паттерн гликозилирования	Масс-спектрометрическое профилирование N-связанных олигосахаридов (МАЛДИ-ВП-МС)
Паттерн гликозилирования	Олигосахариды
Паттерн гликозилирования	Моносахариды
Паттерн гликозилирования	Сиаловая кислота
Термостабильность	Дифференциальная сканирующая калориметрия

Кинетика самоассоциация	и	Анализ кинетики и самоассоциации Biacore
----------------------------	---	---

Таблица 19

Обзор физико-химических характеристик BNJ441

Тест	Техническая серия BNJ441	GMP BNJ441
Аналитическое ультрацентри- фугирование, % мономера	99,3%	99,0%
Анализ молекулярных масс МАЛДИ-ВП-МС (Да)	148 484	148 522
Анализ молекулярных масс ЭСИ-ВП-МС (Да)	Основная изоформа 147830,80 Диапазон 147 000 – 149 500	Основная изоформа 147830,72 Диапазон 147 000 – 149 500

	Анализ PyroQ	Анализ PyroQ
	V	V
N-Концевое секвенирование тяжелой цепи	Q	Q
	L	L
	V	V
	Q	Q
	S	S
	G	G
	A	A
	E	E
	V	V
	K	K
	K	K
	P	P
	G	G
	A	A
	S	S
	V	V
	K	K
	V	V
	S	S

N-концевое секвенирование легкой цепи	D	D
	I	I
	Q	Q
	M	M
	T	T
	Q	Q
	S	S
	P	P
	S	S
	S	S
	L	L
	S	S
	A	A
	S	S
	V	V
	G	G
	D	D
	R	R
	V	V
	T	T
<u>Анализ аминокислот (№)</u>	<u>Остатков на</u> <u>молекулу</u>	<u>Остатков на</u> <u>молекулу 102</u>
ASX(106)	105	
GLX(138)	137	135
SER(166)	170	167
GLY(84)	89	88
HIS(22)	26	26
ARG(36)	42	42
THR(110)	106	105
ALA(64)	68	67
PRO(88)	93	92
TYR(54)	51	53
VAL(128)	127	129
MET(12)	11	11
ILE(28)	26	27
LEU(94)	92	94
PHE(50)	51	51
LYS(82)	68	73

Круговой дихроизм		
<u>Показатель в ближней</u>		
<u>УФ-области</u>	<u>Ближняя УФ-область</u>	<u>Ближняя УФ-область</u>
максимум	(нм)	(нм)
минимум	295	295
максимум	269	269
минимум	266	266
отрицательное	262	262
отклонение	250	250
<u>Показатель в дальней</u>		
<u>УФ-области</u>	<u>Дальняя УФ-область</u>	<u>Дальняя УФ-область</u>
плечо	(нм)	(нм)
	239-231	239-231
максимум	218	218
минимум	201	202
<u>Деконволюция</u>	<u>Деконволюция</u>	<u>Деконволюция</u>
α -спираль	0,030	0,030
3/10 спираль	0,026	0,026
β -лист	0,328	0,334
Повороты	0,156	0,158
Поли-(Pro)-II	0,059	0,061
<u>Неупорядоченные</u>	<u>0,397</u>	<u>0,388</u>
Всего ¹	0,996	0,997
Олигосахариды	<u>m/z (M+Na)+</u>	<u>m/z (M+Na)+</u>
<u>(МАЛДИ-ВП-МС)</u>	1647,61	1647,55
G1F	1501,52	1501,49
G1	1485,56	1485,51
G0F	1339,47	1339,49
G0	1282,46	1282,39
G0F-GN	1257,43	1257,48
Олигоманноза-5 (Man-5)		

<u>Олигосахарид</u>	<u>%</u>	<u>%</u>
M3N2F	0,00	0,00
G0F-GN	0,66	0,93
G0F	90,45	91,26
G1F	8,79	7,7
G2F	0,00	0,00
Олигоманноза-5 (Man-5)	0,09	0,12
aGal1	0,00	0,00
Man-6	0,00	0,00
aGal2	0,00	0,00
Man-7	0,00	0,00
aGal3	0,00	0,00
SA1-1	0,00	0,00
SA1-2	0,00	0,00
SA1/aGal4	0,00	0,00
SA1-3	0,00	0,00
SA1-4	0,00	0,00
SA2-1	0,00	0,00
SA2-2	0,00	0,00
Общий G0F, G1F, G2F	99,24	98,96
Кислые	0,00	0,00
Высокоманнозные	0,09	0,12
aGal	0,00	0,00
Нейтральные	99,99	100,01
Моносиалированные	0,00	0,00
Дисиалированные	0,00	0,00

<u>Моносахарид</u>	<u>(нмоль моносахарида/ мг белка)</u>	<u>(нмоль моносахарида/ мг белка)</u>
GlcNAc	22,14	29,26
GalNAc	0,00	0,00
Галактоза	0,66	0,82
Манноза	20,25	23,24
Фукоза	5,38	6,53
Общий	48	60
‰ Гликозилирования	0,93‰	1,16‰
<u>Сиаловая кислота</u>	<u>(ммоль/моль)</u>	<u>(ммоль/моль)</u>
NGNA	Н.О.	Н.О.
NANA	< LoQ	< LoQ
<u>Калориметрия</u>		
T _m	67,0°C	67,0°C
<u>Кинетика Biacore</u>	4,44e ⁵	4,86e ⁵
k _a (1/Ms)	2,05e ⁻⁴	2,04e ⁻⁴
K _d (1/s)	4,61e ⁻¹⁰	4,21e ⁻¹⁰
K _D (M)	0,0257	0,0347
Хи-квадрат		
<u>Самоассоциация Biacore</u>	7,12e ⁻³	2,71e ⁻⁴
K _D (M)	0,147	0,359
Хи-квадрат		

В Таблице 19 приведены интактные молекулярные массы, определенные для технической серии как 147830,80 Да и для GMP-серии как 147830,72 Да. Указанные значения совпадали с расчетным значением молекулярной массы основного компонента BNJ441, составляющим 147 827,62 Да, в Таблице 17, при точности измерения масс ± 100 ч./млн. методом ЭСИ-ВП-МС при внешней калибровке. За пределами диапазона 147000–149500 Да выраженных пиков не наблюдалось. В указанном способе молекулу идентифицируют на основании интактной молекулярной массы. Экспериментальные образцы вводили в колонку C4 для ОФ-ВЭЖХ и элюировали в градиенте водного:органического растворителя.

Затем элюат электрораспылением вводили во времяпролетный масс-спектрометр и спектр верхней половины хроматографического пика разделяли для определения интактной молекулярной массы.

В Таблице 19 приведены N-концевые последовательности, определенные для серий BNJ441. Определенные N-концевые последовательности тяжелой цепи и легкой цепи совпадали с последовательностью аминокислот в сериях BNJ441. Было обнаружено, что тяжелая цепь блокируется PyroQ, как и ожидалось, и разблокируется пироглутаматаминопептидазой (PGAP). Авторы изобретения определяли первичную последовательность белка на N-конце полипептидной цепи с применением последовательной деградации по Эдману и анализа ВЭЖХ.

В Таблице 19 представлен анализ количества остатков аминокислот на молекулу для серий BNJ441. Все указанные значения совпадали с расчетным числом остатков на молекулу для BNJ441 на основании первичной последовательности, приведенным в первом столбце Таблицы 19. Данные при анализе аминокислот регистрировали в трех повторностях. В указанном способе оценку первичной структуры молекулы проводят с применением кислотного гидролиза белка для получения отдельных аминокислотных компонентов. Указанный способ не позволяет детектировать цистеин или триптофан. Аспарагин и аспартат детектировали в одном пике и обозначали как Asx. Глутамин и глутамат также детектировали в одном пике и обозначали как Glx. 14 из 20 стандартных аминокислот однозначно детектировались с применением указанного способа; всего, вместе с группами Asx и Glx, детектировали 16 аминокислот. Из представленных АК всего BNJ441 содержит 1262 остатков, которые могут быть детектированы с применением указанных способов.

В Таблице 19 приведен локальный показатель кругового дихроизма (CD) в ближней УФ-области, локальный показатель в дальней УФ-области и результаты деконволюции для серий BNJ441. Деконволюция позволяет определить количества α -спиральных, 3/10-спиральных, β -складчатых структур, поворотов, поли-(Pro)-II и неупорядоченных структур с применением программного

обеспечения CDPro на основании заданной эталонной совокупности. Определяли спектры CD для ближней УФ-области (третичная структура) и для дальней УФ-области (вторичная структура) для каждой серии. В указанном способе оценку молекулярной структуры высших порядков (2° и 3°) в молекуле проводят с использованием избирательного поглощения левого и правого лучей с круговой поляризацией, наблюдаемого в полосах поглощения оптически активных (хиральных) молекул, таких как белки. Проводили деконволюцию спектров CD; результаты приведены в Таблице 19.

В Таблице 19 приведена среднее молекулярная масса для каждого проанализированного гликана. Наблюдаемые молекулярные массы N-связанных олигосахаридов или гликанов для серий BNJ441 совпадали с теоретическими молекулярными массами гликанов, приведенными в Таблице 20. Масс-спектры свободных гликанов определяли с применением масс-спектрометрии МАЛДИ-ВП. В указанном способе по молекулярной массе идентифицируют гликаны, связанные с молекулой лекарственного средства. Предварительно гликаны с помощью ферментативного расщепления пептид-N-гликозидазой F отделяли от антитела. Затем гликаны выделяли путем твердофазной экстракции, смешивали с матричным раствором 3,4-дигидроксibenзойной кислоты и совместно осаждали на мишени МАЛДИ. Указанный высушенный образец вводили во времяпролетный масс-спектрометр с ионизацией азотным лазером. Получали спектр m/z $(M+Na)^+$.

Таблица 20

Теоретическая молекулярная масса гликанов

Гликановая Структура	Теоретическое значение m/z $(M+Na)^+$
G1F	1647, 58
G1	1501, 53
G0F	1485, 53
G0	1339, 47
G0F-GN	1282, 45
Олигоманноза-5 (Man-5)	1257, 41

Процентное содержание олигосахаридов, определенное для

серий BNJ441, приведено в Таблице 19. Вычисляли общие значения для различных типов N-связанных олигосахаридов: (общие G0F, G1F), кислые, высокоманнозные, нейтральные, моносиалированные и дисиалированные. N-связанные олигосахариды содержали только нейтральные олигосахариды. Уровень нейтральных олигосахаридов составлял 99,99 и 100,0% для технической серии и GMP-серии, соответственно. Олигосахариды детектировали с применением ВЭЖХ и количественно оценивали хроматограммы. В указанном способе оценку паттерна гликозилирования проводят путем идентификации N-связанных олигосахаридов, связанных с молекулой лекарственного средства, на основании времени удержания ферментативно отщепленных флуоресцентно меченых олигосахаридов. Указанный способ позволяет определить относительное содержание каждого вида олигосахарида. Вкратце, олигосахариды с помощью ферментативного расщепления пептид-N-гликозидазой F отделяли от антитела и метили антраниловой кислотой. Избыток антраниловой кислоты удаляли на этапе фильтрации с применением жидкостной хроматографии с гидрофобным взаимодействием. Образцы вводили в систему ВЭЖХ с использованием слабого анионного обмена (wAX-ВЭЖХ) с колонкой Showa Denko Asahipak Amino Column и меченые олигосахариды детектировали с помощью флуоресцентного детектора; возбуждение: 360 нм, эмиссия: 420 нм.

Определяли процентное содержание моносахаридов для серий BNJ441; данные приведены в Таблице 19. Процентное содержание моносахаридов определяли для пяти моносахаридов (GlcNAc, GalNAc, галактоза, манноза, фукоза) с применением флуоресцентного мечения с последующей высокоэффективной хроматографией с обращенной фазой (ОФ-ВЭЖХ). В указанном анализе определение паттерна гликозилирования осуществляют путем определения моносахаридов, связанных с молекулой лекарственного средства, на основании времени удержания флуоресцентно меченых моносахаридов. Вкратце, при кислотном гидролизе олигосахариды удаляют из белка и они распадаются на составляющие моносахариды. Затем свободные моносахариды метили антраниловой кислотой (АК) посредством восстановительного аминирования. Затем образцы вводили в систему ОФ-ВЭЖХ с

колоной Waters Symmetry® C-18 и меченые АК моносахариды детектировали с помощью флуоресцентного детектора; возбуждение: 360 нм, эмиссия: 420 нм. Образцы тестировали в двух повторностях и зарегистрированное значение соответствовало среднему двух результатов.

Затем авторы определяли содержание сиаловых кислот: N-ацетилнейраминовой кислоты (NANA) и N-гликолилнейраминовой кислоты (NGNA). В каждом случае определенное содержание сиаловых кислот NANA и NGNA в сериях BNJ441 было меньше предела количественного определения (< 6 ммоль/моль), как показано в Таблице 19. Ни в одной серии не наблюдалось присутствия NGNA. Содержание сиаловых кислот измеряли после разделения с помощью ОФ-ВЭЖХ и флуоресцентного мечения с применением многоточечной калибровки. В указанном способе оценку паттерна гликозилирования осуществляют на основании определения типа и относительного количества сиаловых кислот, связанных с молекулой лекарственного средства. Сиаловые кислоты химически отщепляли от антитела путем инкубации с бисульфатом натрия, и затем метили О-фенилендиамином. Образцы вводили в систему ОФ-ВЭЖХ с колоной Beckman C18 Ultrasphere и меченые сиаловые кислоты детектировали с помощью флуоресцентного детектора (возбуждение: 230 нм; эмиссия: 425 нм). Образцы тестировали в двух повторностях и регистрировали среднее для двух результатов.

Определенное значение T_m для каждой серии BNJ441 составляло $67,0^{\circ}\text{C}$, как показано в Таблице 19. Проводили дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК) и калориметрический данные регистрировали с применением калориметра Micro-Cal VP-DSC в сканирующем режиме с нагреванием со скоростью $75^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ от 20°C до 95°C . Калибровку оси Y и температуры проводили до тестирования образцов. % ошибки отклонения оси Y составлял $<1\%$ и точки перехода находились в пределах заданного диапазона $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ и для $28,2^{\circ}\text{C}$, и для $75,9^{\circ}\text{C}$. Образцы сканировали на фоне пустых ячеек, содержащих ту же буферную композицию в том же объеме. В анализе ДСК измеряют

энтальпию (ΔH) при разворачивании укладки в результате тепловой денатурации. В растворе в равновесном соотношении присутствует биомолекула находится в природной конформации (в укладке) и в денатурированном состоянии (без укладки). Точка перехода (T_m) представляет собой температуру, при которой 50% белка находится в природной конформации, а 50% денатурировано. T_m для каждого образца определяют путем измерения ΔH в градиенте температур в ячейке с образцом относительно пустой ячейки.

Аффинность (KD) для BNJ441 материалов технической серии и GMP-серии составляла 461 пМ и 421 пМ, соответственно, с хорошим соответствием. Кинетика связывания для каждой серии BNJ441 представлена в Таблице 19. Поверхностный плазмонный резонанс (Biacore 3000) использовали для оценки кинетики связывания антитела против С5 (BNJ441) с С5 человека. Сенсограммы не показаны. Кинетику связывания BNJ441 с С5 определяли с применением метода захвата Fc человека. Антитела против Fc человека (KPL # 01-10-20), разведенные до 0,1 мг/мл в 10 мМ ацетате натрия с pH 5,0 иммобилизовали на двух проточных ячейках CM5-чипа в течение 8 минут с применением реакции сочетания аминов. Антитело против С5 (BNJ441) разбавляли до 0,35 мкг/мл в подвижном буфере (HBS-EP, 0,01M HEPES, 0,15M NaCl, 3 мМ ЭДТК, 0,005% P20, pH 7,4). Разведенное антитело затем вводили в другую проточную ячейку, с последующим введением С5 (0,19–6 нМ) в обе проточные ячейки. Дополнительную проточную ячейку использовали в качестве эталона. Поверхность каждый раз регенерировали 20 мМ HCl, 0,01% P20 (100 мкл/мин, введение 200 мкл). Данные обрабатывали с использованием модели Ленгмюра 1:1 в ПО BIAevaluation 4.1 с «двойным сравнением».

Аффинность (KD) самоассоциации BNJ441 материалов технической серии и GMP-серии составляла 7,1 мМ и 0,27 мМ, соответственно. См. Таблицу 19. Неудовлетворительное соответствие было обусловлено низкими уровнями связывания, наблюдаемыми для BNJ441 материалов и технической серии, и GMP-серии, уровни самоассоциации и измеренная аффинность были ниже пределов детекции инструмента. Низкий уровень самоассоциации

благоприятен для технологичности и, в конечном счете, для введения пациентам. Сенсограммы не показаны. Поверхностный плазмонный резонанс (Biacore 3000) использовали для оценки кинетики самоассоциации антитела против С5 (BNJ441). Кинетику самоассоциации BNJ441 определяли путем прямой иммобилизации антитела (BNJ441). BNJ441 разбавляли приблизительно до 31 мкг/мл в 10 мМ ацетате натрия, pH 5,0, иммобилизовали в одной проточной ячейке CM5-чипа для получения 2000 RU путем реакции сочетания аминов. Дополнительную проточную ячейку использовали в качестве эталона. Затем разведения антитела против С5, BNJ441 (1,6–50 мкМ в подвижном буфере, HBS-EP, 0,01 М HEPES, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЭДТК, 0,005% P20, pH 7,4) вводили в обе проточные ячейки. Регенерация не требовалась ввиду незначительного связывания. Данные обрабатывали с использованием равновесной аффинной модели в ПО BIAevaluation 4.1 с «двойным сравнением».

Физико-химические характеристики BNJ441 определяли с использованием технической и GMP-серии; было показано, что они соответствуют последовательности аминокислот указанного антитела. Физико-химические данные, обобщенные в указанном примере, включают ряд характеристик, в том числе чистоту, размер молекул, идентификационные данные, структуру, гликозилирование, термостабильность, кинетику и самоассоциацию, и, как предполагается, будут служить основой для определения характеристик нерасфасованного лекарственного вещества BNJ441.

Хотя настоящее изобретение раскрыто на примерах конкретных вариантов реализации, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что различные изменения и замены на эквиваленты могут быть внесены без отступления от объема и существа настоящего изобретения. Кроме того, могут осуществляться многие модификации для адаптации конкретной представляющей интерес ситуации, материала, композиции, процесс, этапа или этапов способа в соответствии с целью, существом и объемом настоящего изобретения. Предполагается, что все такие модификации входят в объем настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (i) CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:23,
- (ii) CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:19,
- (iii) CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:3,
- (iv) CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:4,
- (v) CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:5, и
- (vi) CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:6.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

- (i) CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:23,
- (ii) CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:19,
- (iii) CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:3,
- (iv) CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:4,
- (v) CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:5, и
- (vi) CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:6,

дополнительно включающий вариант константной области Fc человека, который связывается с неонатальным Fc-рецептором человека (FcRn), причем CH3 варианта константной области Fc человека содержит замены Met-429-Leu и Asn-435-Ser в положениях, соответствующих метионину в положении 428 и аспарагину в положении 434 константной области нативного человеческого IgG в соответствии с системой нумерации ЕС.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, содержащие переменную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 12, и переменную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 8.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, содержащие константную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 13.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, содержащие полипептид тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14, и полипептид легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с C5 человека при значении pH 7,4 и температуре 25°C с константой диссоциации аффинной связи (K_D) в диапазоне $0,1 \text{ нМ} \leq K_D \leq 1 \text{ нМ}$.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с C5 человека при значении pH 6,0 и 25°C с $K_D \geq 10 \text{ нМ}$.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где $[(K_D \text{ антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в отношении C5 человека при pH 6,0 и при 25°C}) / (K_D \text{ антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в отношении C5 человека при pH 7,4 и при 25°C})]$ превышает 25.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не содержат детектируемые остатки сиаловой кислоты.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где это антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет период полувыведения из сыворотки крови человека, который составляет по меньшей мере

30 дней.

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где это антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет период полувыведения из сыворотки крови человека, который составляет по меньшей мере 40 дней.

12. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов.

13. Терапевтический набор, содержащий: (i) выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-11 и (ii) средство доставки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента человеку.

14. Терапевтический набор по п.13, в котором средство представляет собой шприц.

15. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1.

16. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2.

17. Нуклеиновая кислота, кодирующая определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который связывается с компонентом комплемента C5 человека, содержащим аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12.

18. Нуклеиновая кислота, кодирующая определяющие комплементарность области (CDR) вариабельных областей тяжелой и легкой цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который связывается с компонентом комплемента C5 человека, содержащим аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 12 и 8, соответственно.

19. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который связывается с компонентом комплемента C5 человека, содержащим аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12.

20. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменные области тяжелой и легкой цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который связывается с компонентом комплемента C5 человека, содержащим аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 12 и 8, соответственно.

21. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который связывается с компонентом комплемента C5 человека, содержащим аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14.

22. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который связывается с компонентом комплемента C5 человека, где полипептид тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14, и полипептид легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11.

23. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая две последовательности, кодирующие переменную область, причем эти последовательности, независимо от их ориентации, кодируют переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8.

24. Композиция, содержащая две нуклеиновые кислоты, где первая нуклеиновая кислота кодирует переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, а вторая нуклеиновая кислота кодирует переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8.

25. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп.15-22.

26. Клетка, содержащая экспрессионный вектор по п.25.

27. Клетка по п.24, отличающаяся тем, что клетка представляет собой клетку CHO.

28. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с компонентом комплемента C5

человека, где способ включает культивирование клетки по п. 26 или 27 в условиях и на протяжении времени, достаточных для экспрессии клеткой антитела, кодируемого нуклеиновой кислотой.

29. Способ по п.28, дополнительно включающий выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

30. Способ лечения пациента, страдающего C5-опосредованным комплемент-ассоциированным состоянием, где способ включает введение пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-11.

31. Способ лечения пациента, страдающего пароксизмальной ночной гемоглобинурией (ПНГ), включающий введение пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-11.

32. Способ лечения пациента, страдающего атипичным гемолитико-уремическим синдромом (аГУС), включающий введение пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-11.

33. Способ лечения пациента, страдающего C5-опосредованным комплемент-ассоциированным состоянием, где способ включает введение пациенту фармацевтической композиции по п.12.

34. Способ лечения пациента, страдающего пароксизмальной ночной гемоглобинурией (ПНГ), включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п.12.

35. Способ лечения пациента, страдающего атипичным гемолитико-уремическим синдромом (аГУС), включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п.12.

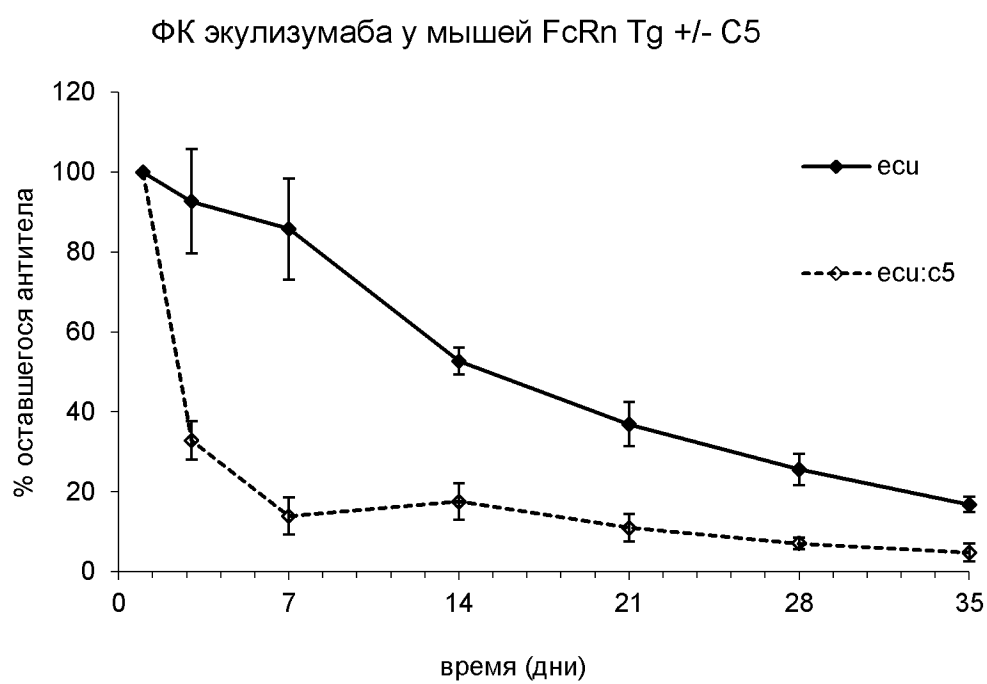
36. Способ лечения пациента, страдающего C5-опосредованным комплемент-ассоциированным состоянием, где способ включает введение пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, эффективном для лечения C5-опосредованного комплемент-ассоциированного состояния, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с компонентом комплемента C5 человека, ингибирует расщепление C5 на фрагменты C5a и C5b и содержит:

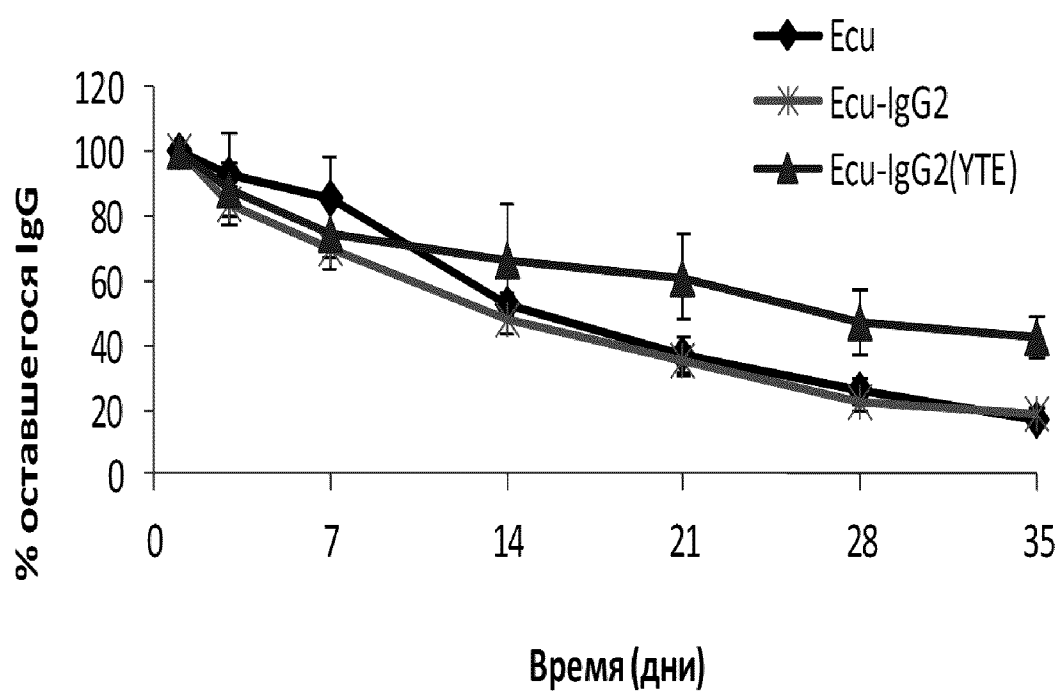
полипептид тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14, и полипептид

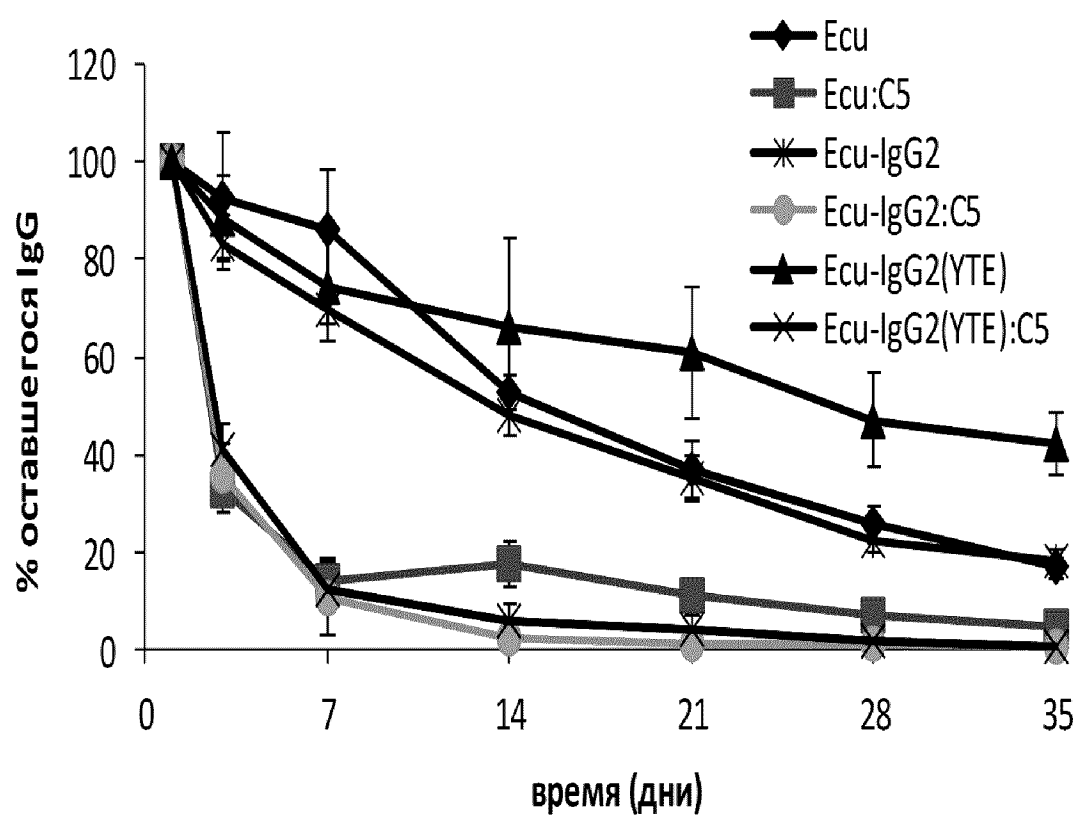
легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11.

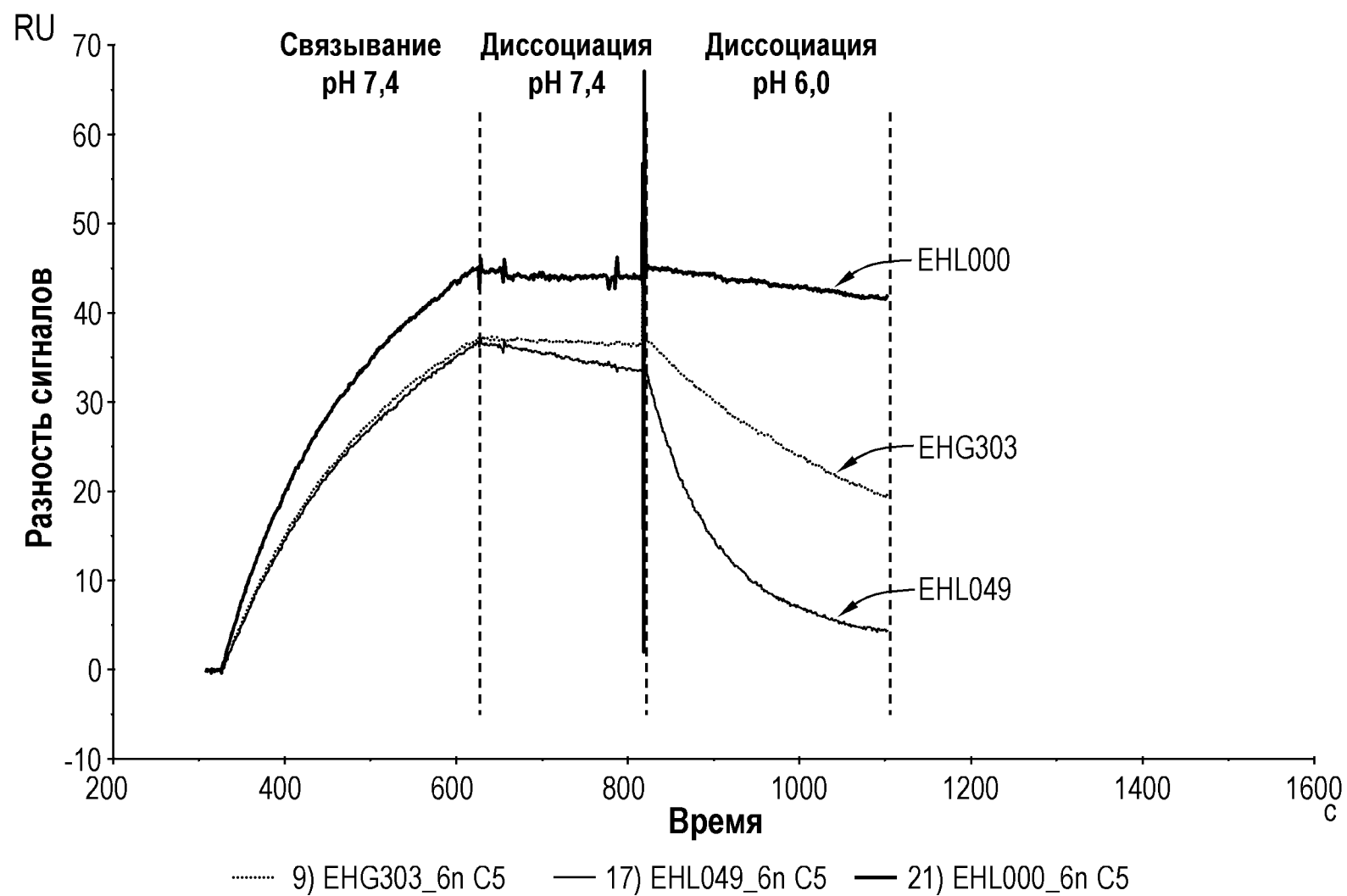
37. Способ по п. 30, 33 или 36, отличающийся тем, что С5-опосредованное комплемент-ассоциированное состояние выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита, синдрома антифосфолипидных антител, волчаночного нефрита, ишемически-реперфузионного повреждения, типичного гемолитико-уремического синдрома, болезни плотного осадка, нейромиеелита зрительного нерва, мультифокальной двигательной нейропатии, рассеянного склероза, макулярной дегенерации, HELLP-синдрома, спонтанной потери плода, тромботической тромбоцитопенической пурпуры, слабоиммунного васкулита, буллезного эпидермолиза, рецидивирующей потери плода, травматического повреждения головного мозга, миокардита, цереброваскулярного расстройства, расстройства периферических сосудов, реноваскулярного расстройства, заболевания сосудов брыжейки/ЖКТ, васкулита, нефрита при пурпуре Шенлейна-Геноха, ассоциированного с системной красной волчанкой васкулита, связанного с ревматоидным артритом васкулита, васкулита с иммунными комплексами, синдрома Такаясу, дилатационной кардиомиопатии, диабетической ангиопатии, болезни Кавасаки, венозной газовой эмболии, рестеноза после размещения стента, ротационной атерэктомии, чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики, тяжелой миастении, болезни холодовой агглютинации, дерматомиозита, пароксизмальной холодовой гемоглобинурии, антифосфолипидного синдрома, болезни Грейвса, атеросклероза, болезни Альцгеймера, сепсиса при системной воспалительной реакции, септического шока, повреждения спинного мозга, гломерулонефрита, отторжения трансплантата, тиреоидита Хашимото, диабета I типа, псориаза, пузырчатки, аутоиммунной гемолитической анемии, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, синдрома Гудпасчера, болезни Дегоса, катастрофического антифосфолипидного синдрома (КАФС), пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ) и атипичного гемолитико-уремического синдрома (аГУС).

По доверенности

**Фиг. 1**

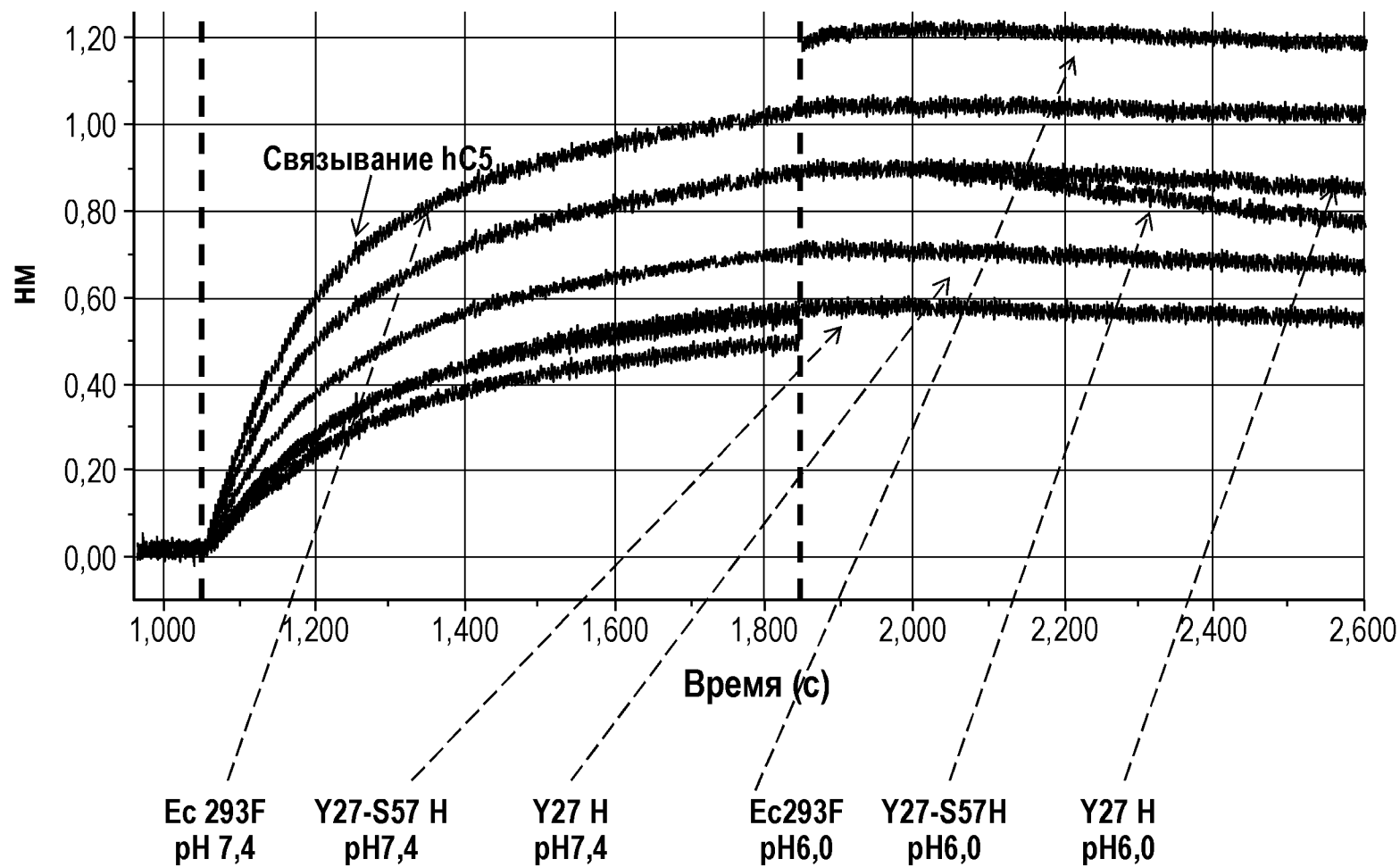
**Фиг. 2**

**Фиг. 3**

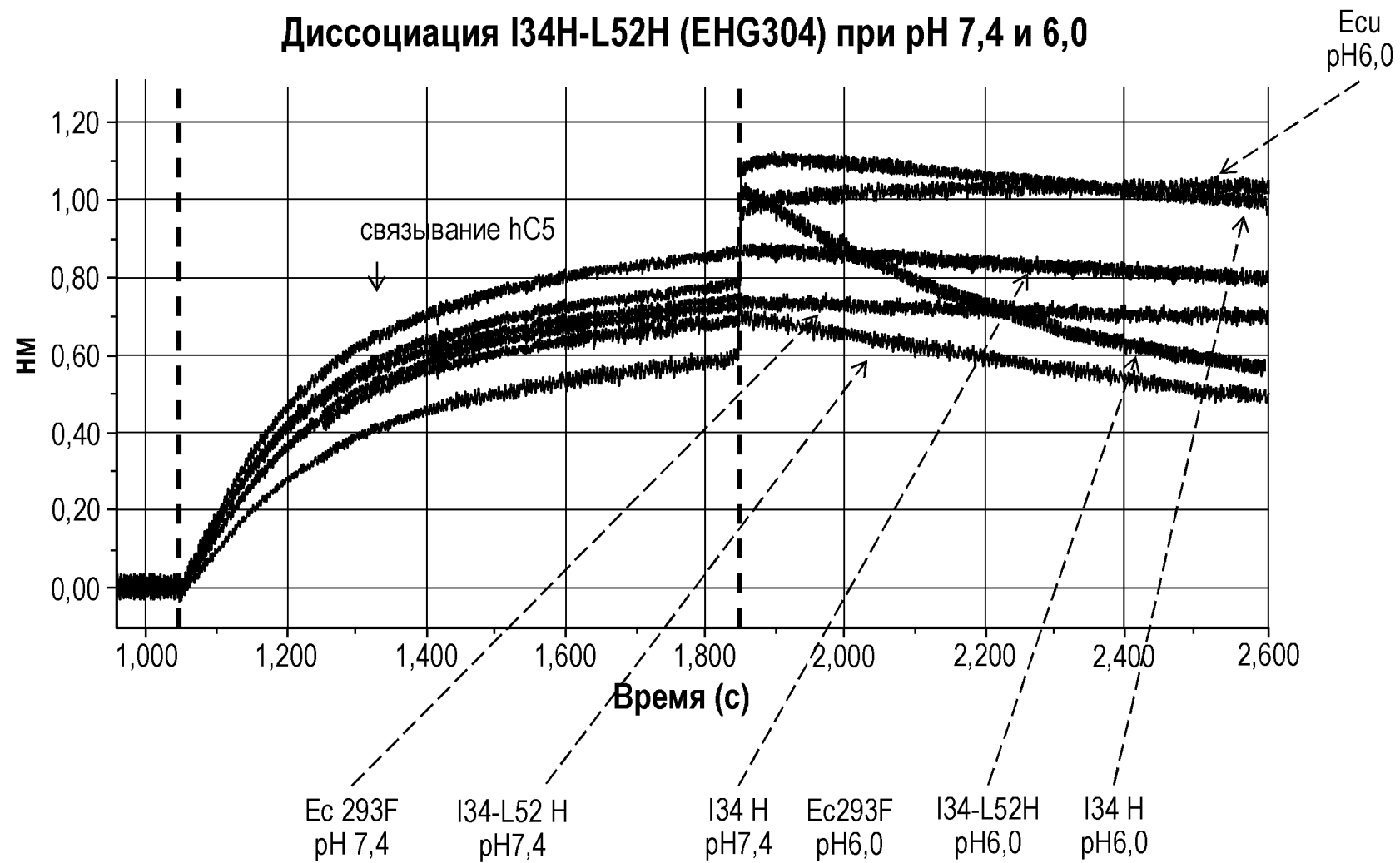


Фиг. 4

Диссоциация Y27H-S57H (ENG303) при pH 7,4 и 6,0

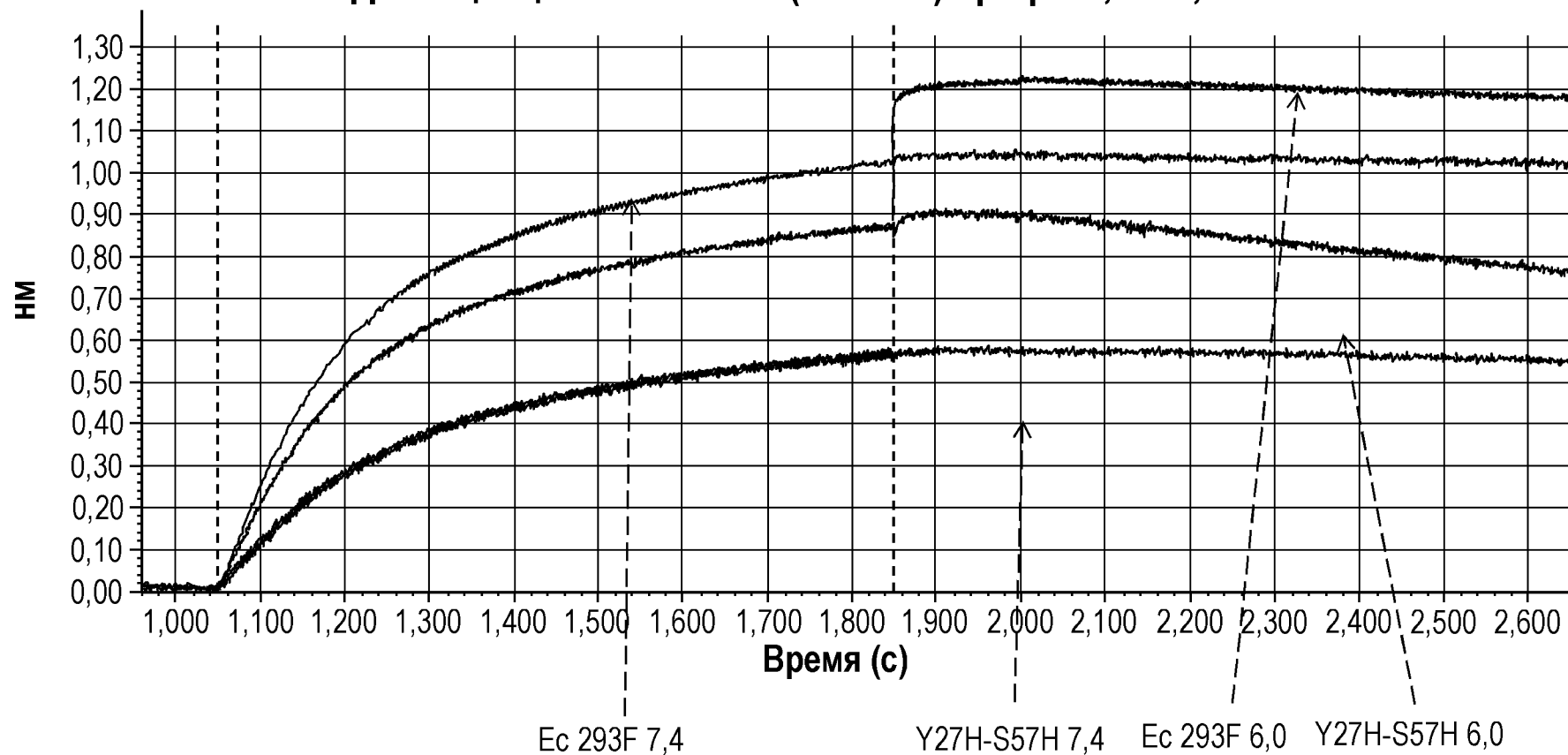


Фиг. 5А



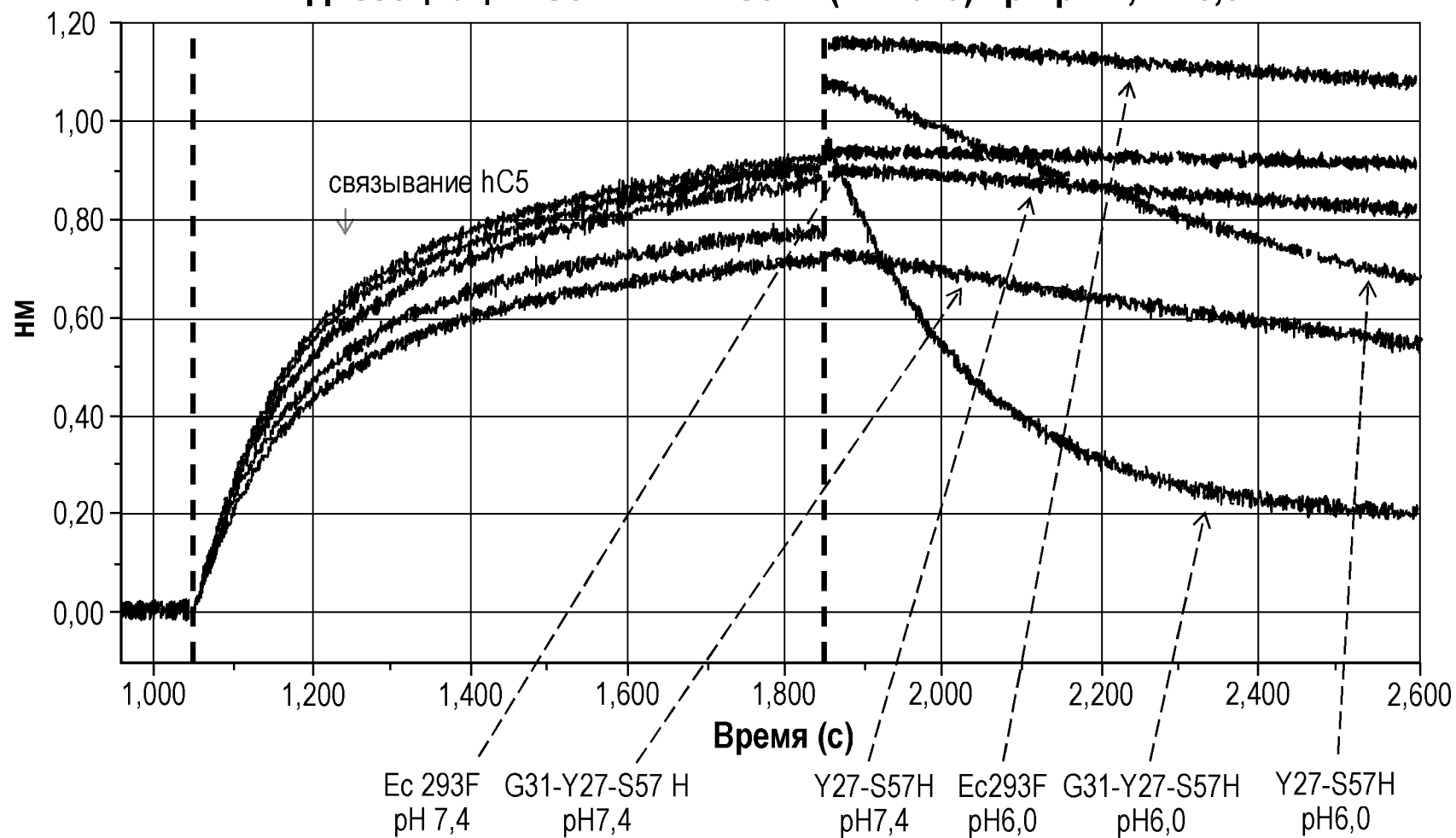
Фиг. 5В

Диссоциация Y27H-S57H (ENG303) при pH 7,4 и 6,0



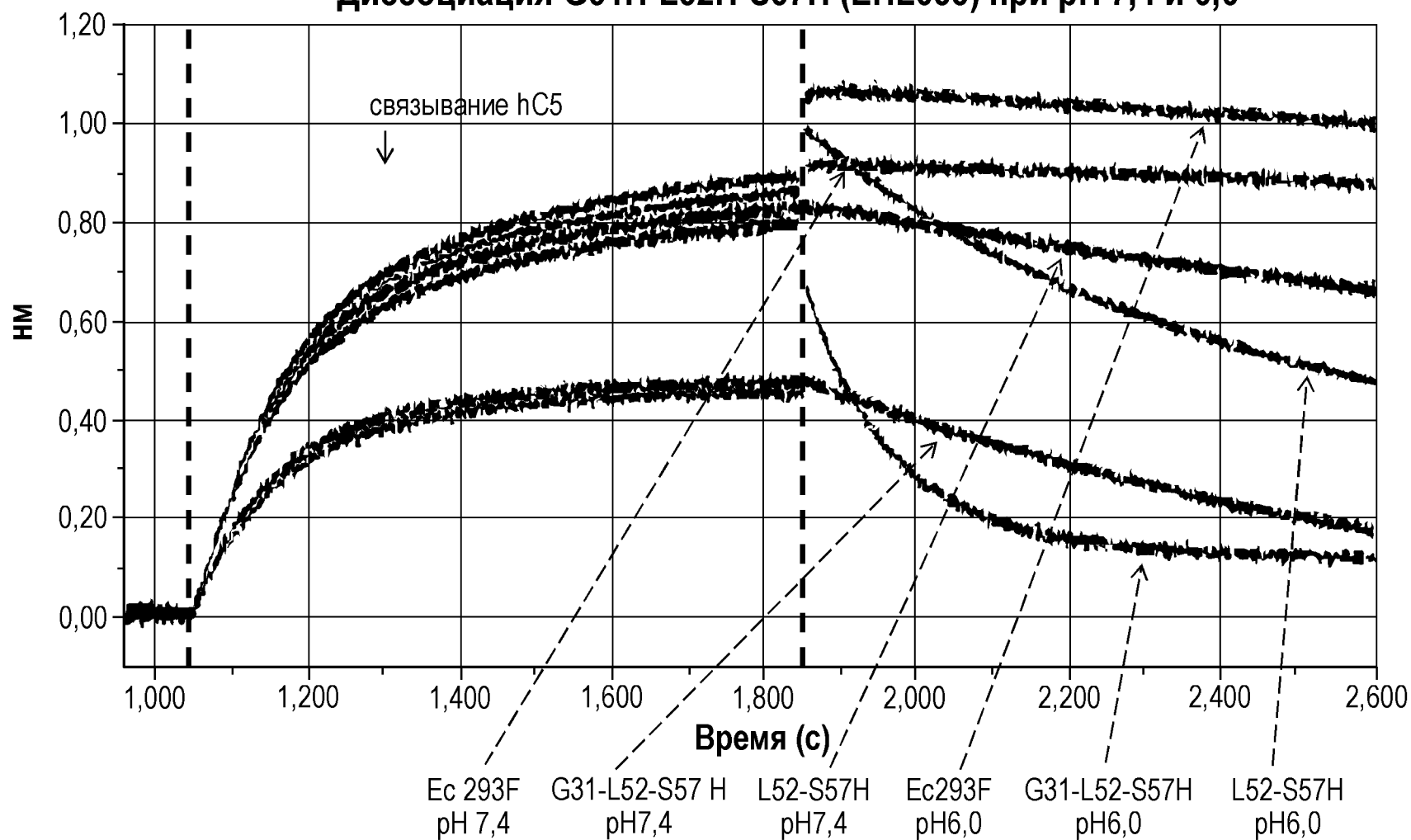
Фиг. 5С

Диссоциация G31H-Y27H-S57H (EHL049) при pH 7,4 и 6,0



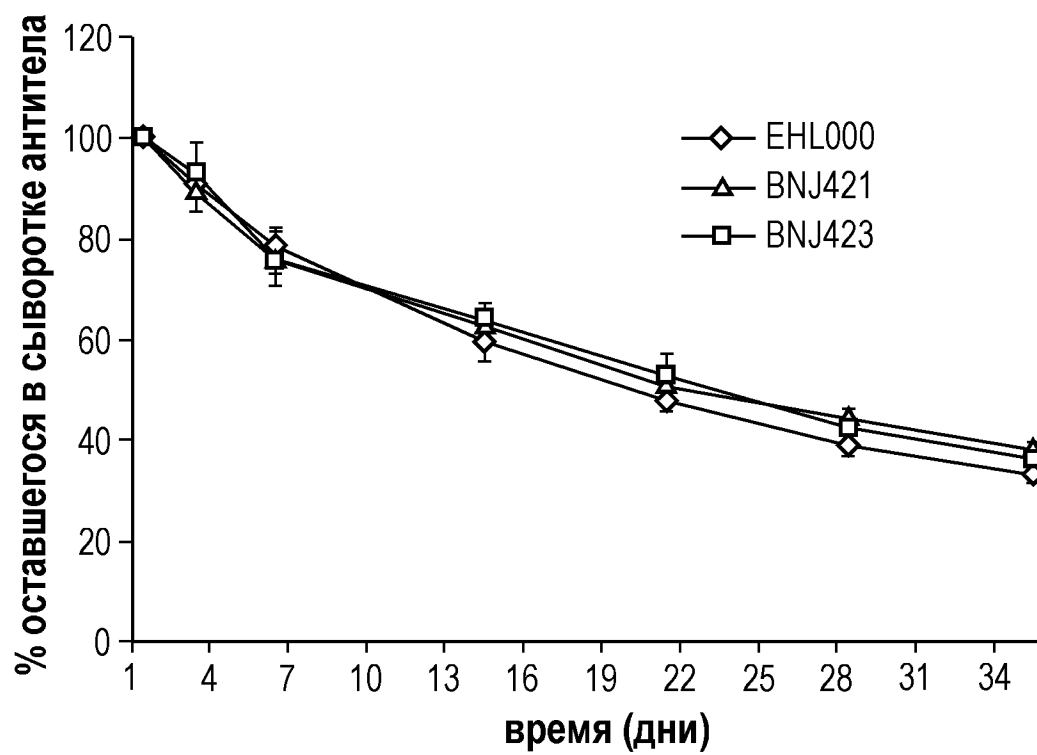
Фиг. 5D

Диссоциация G31H-L52H-S57H (EHL058) при pH 7,4 и 6,0

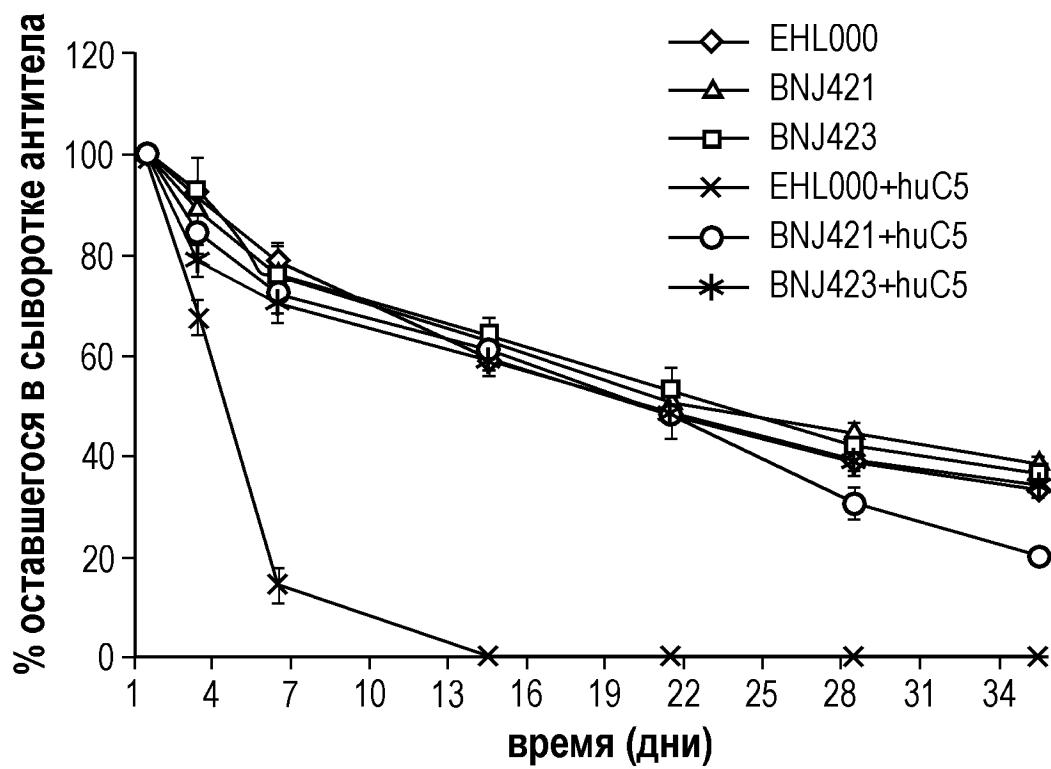


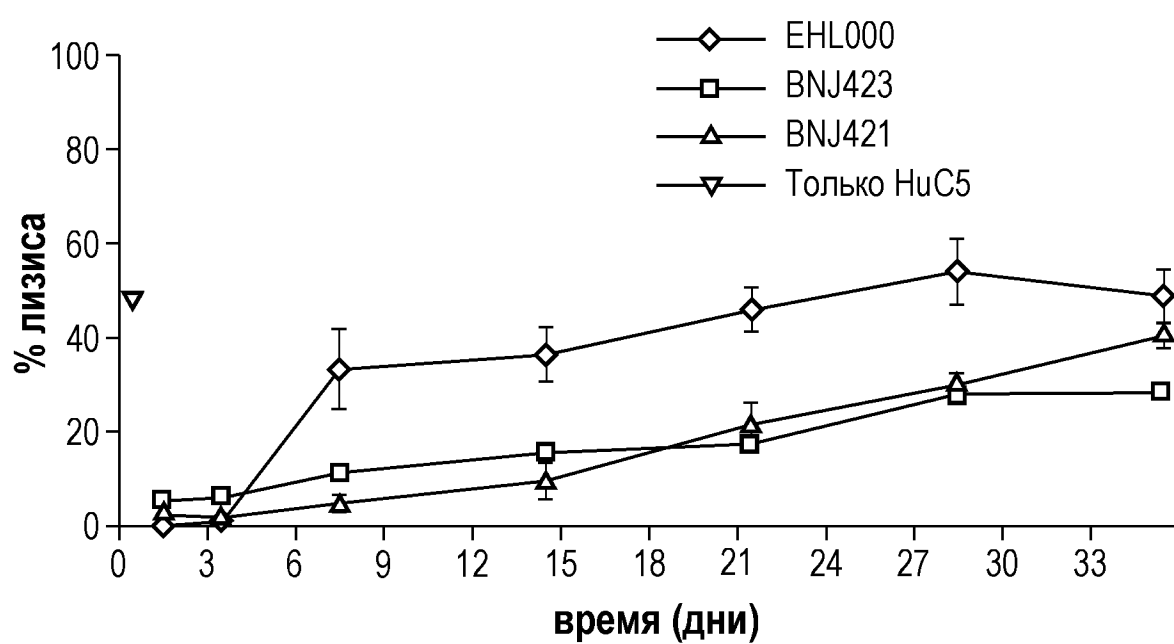
Фиг. 5Е

10/29

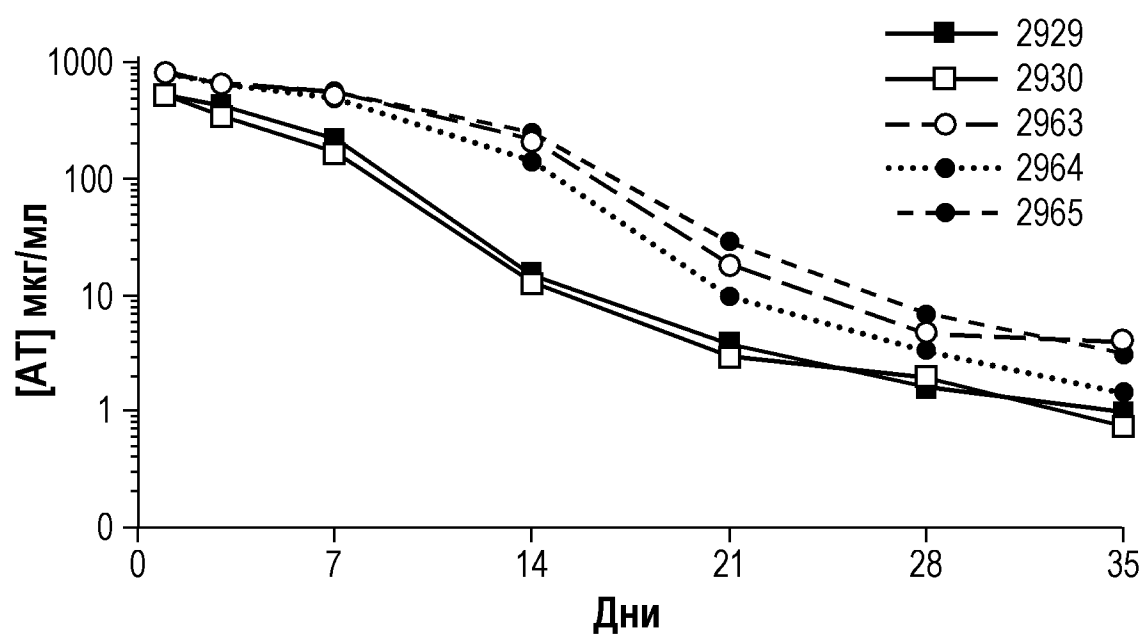


Фиг. 6

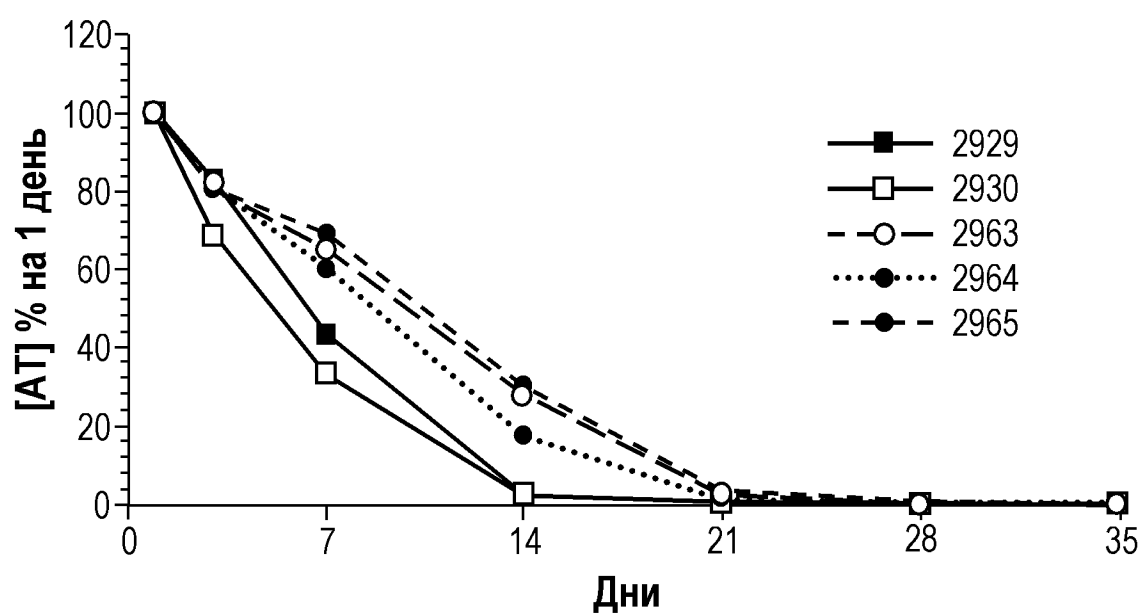
**Фиг. 7**

Гемолиз – Ex Vivo**Фиг. 8**

13/29

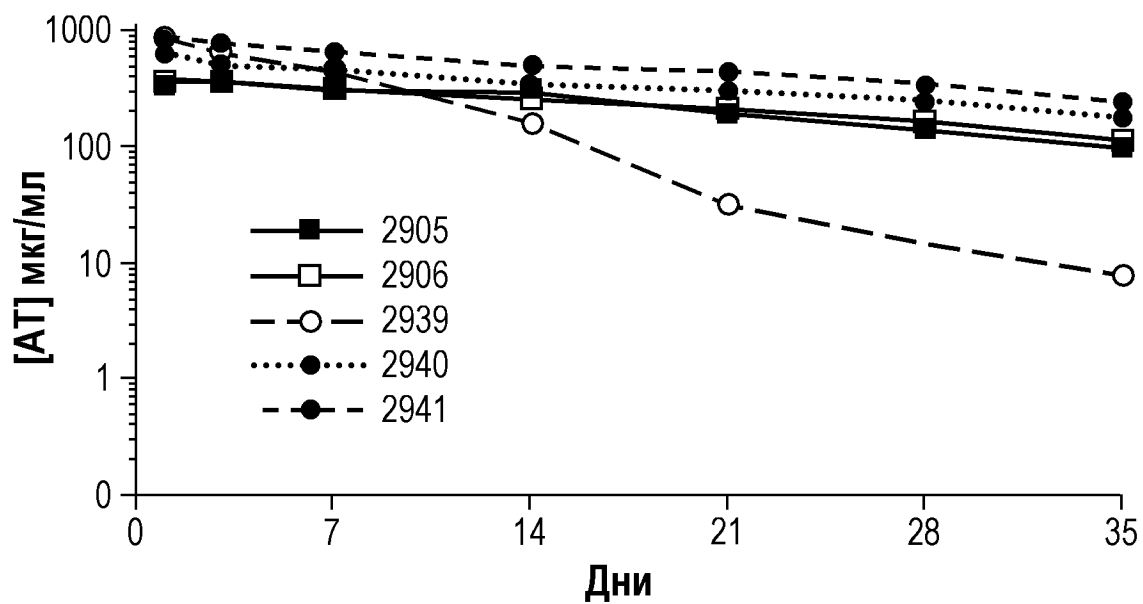


Фиг. 9А

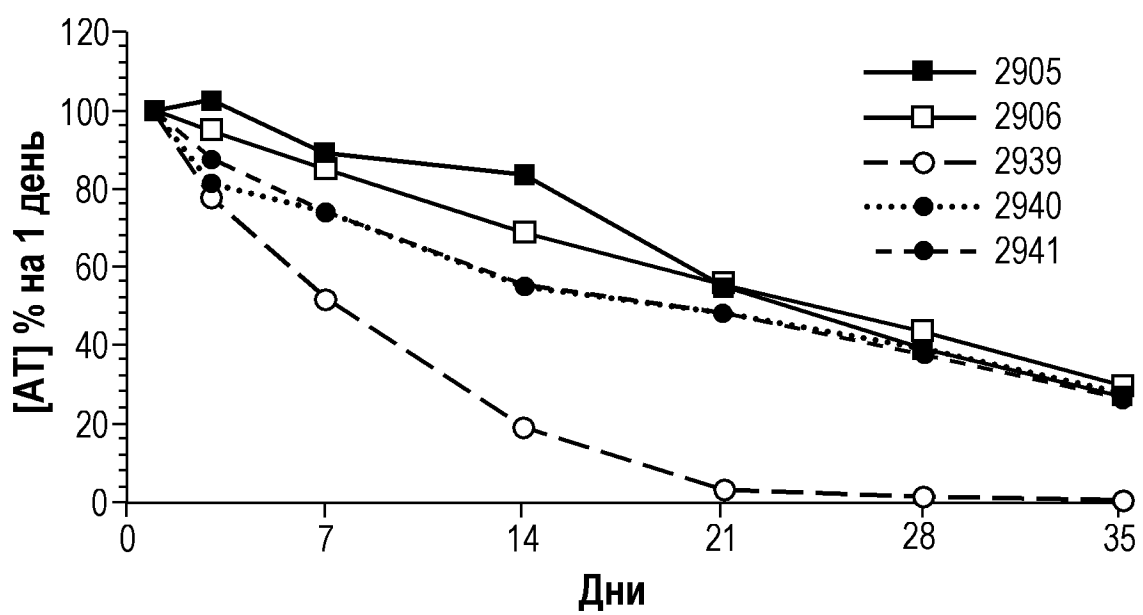


Фиг. 9В

14/29

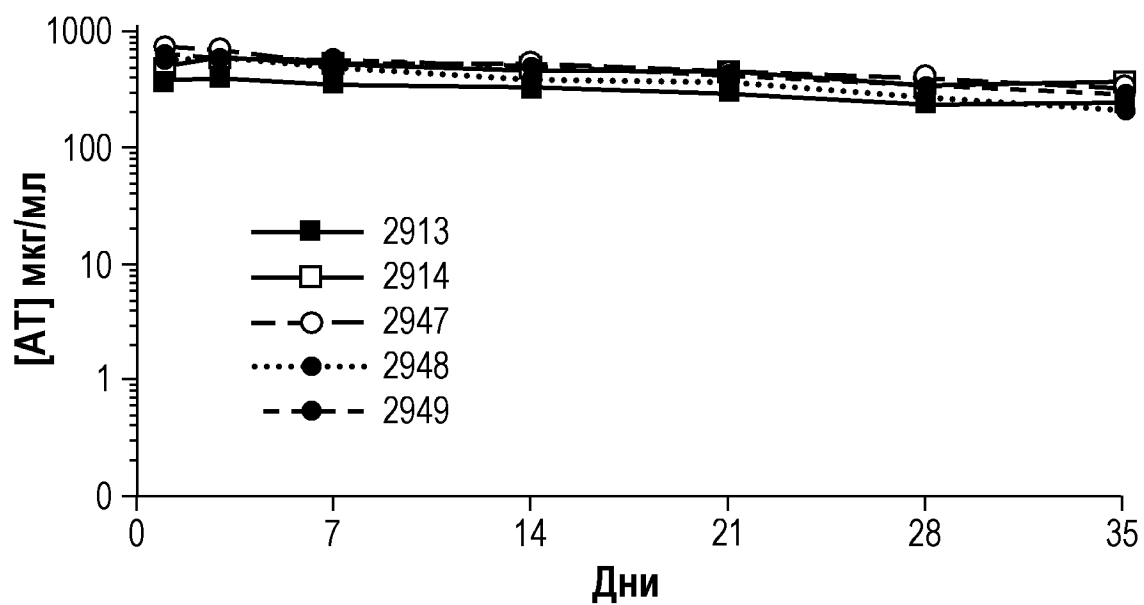


Фиг. 10А

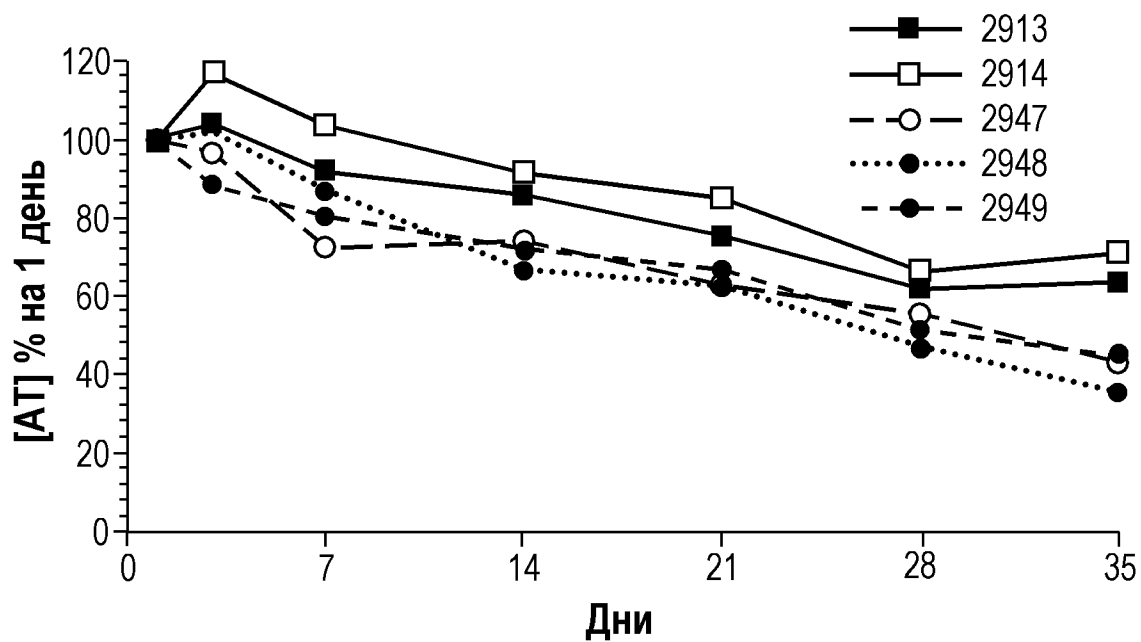


Фиг. 10В

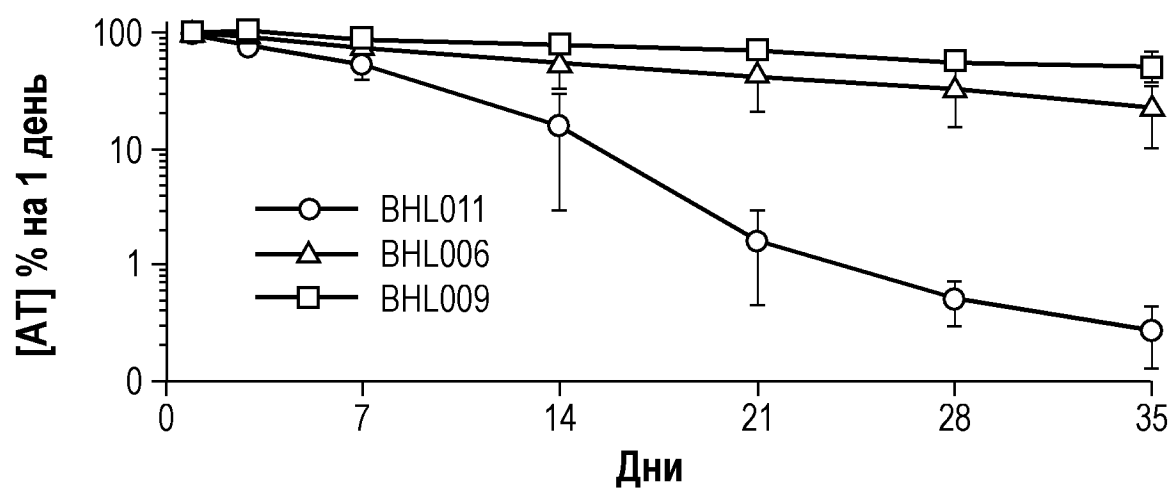
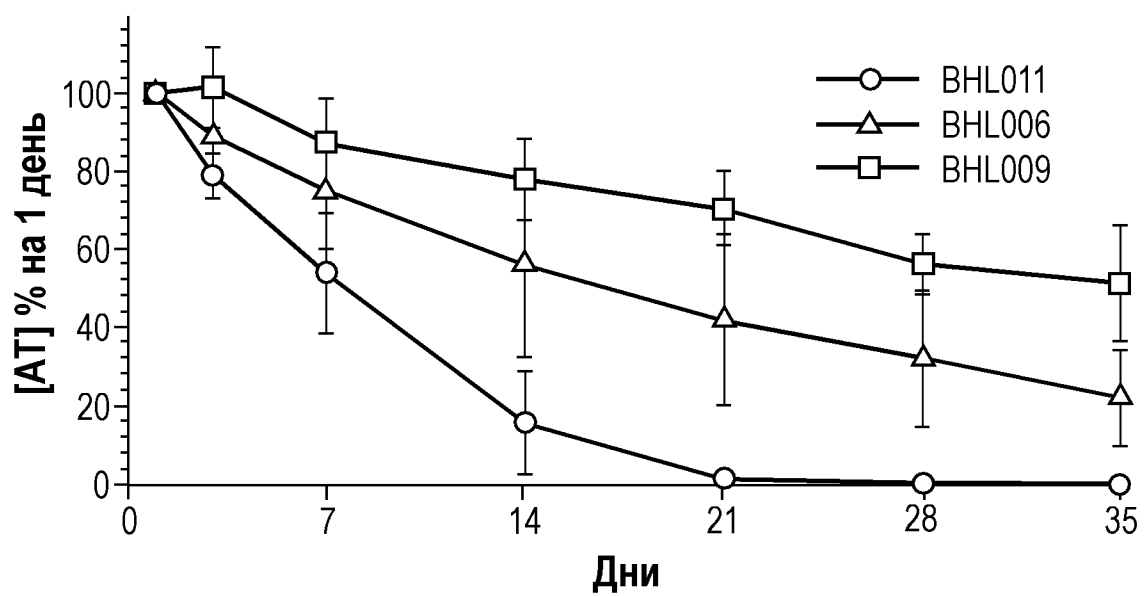
15/29

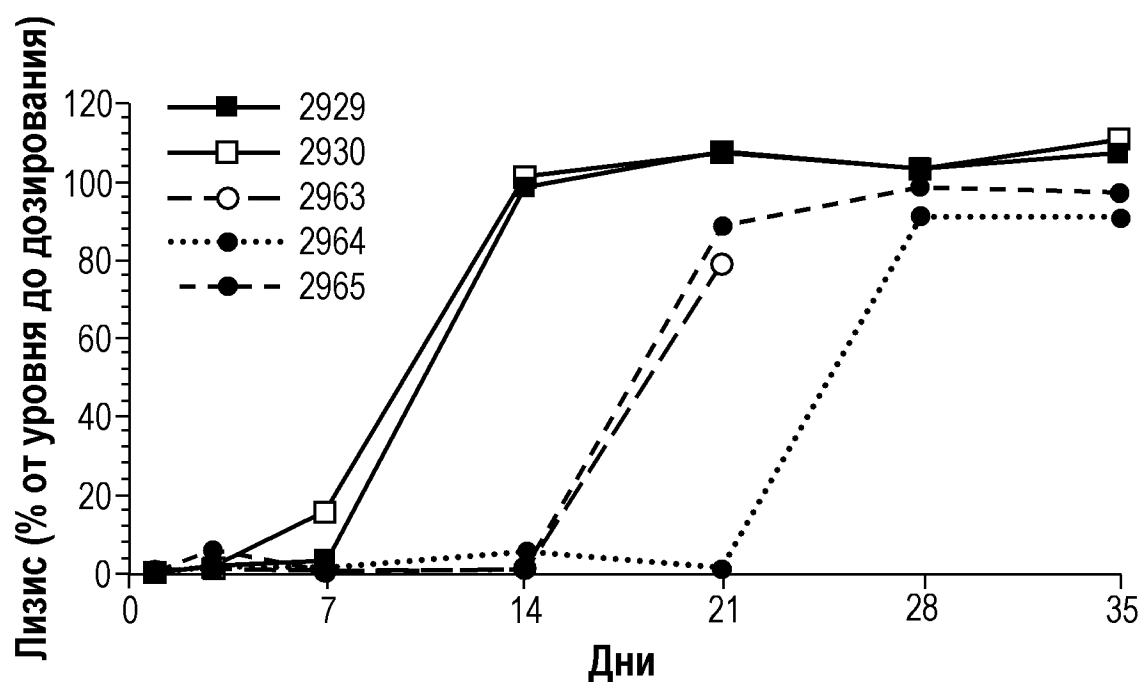
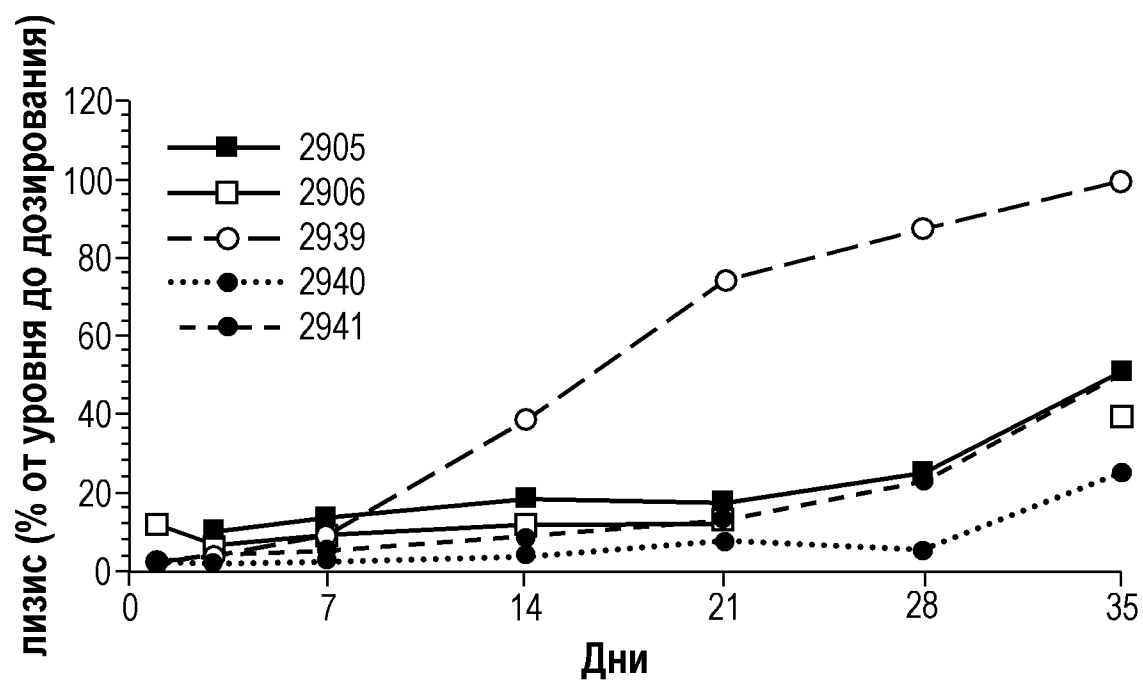


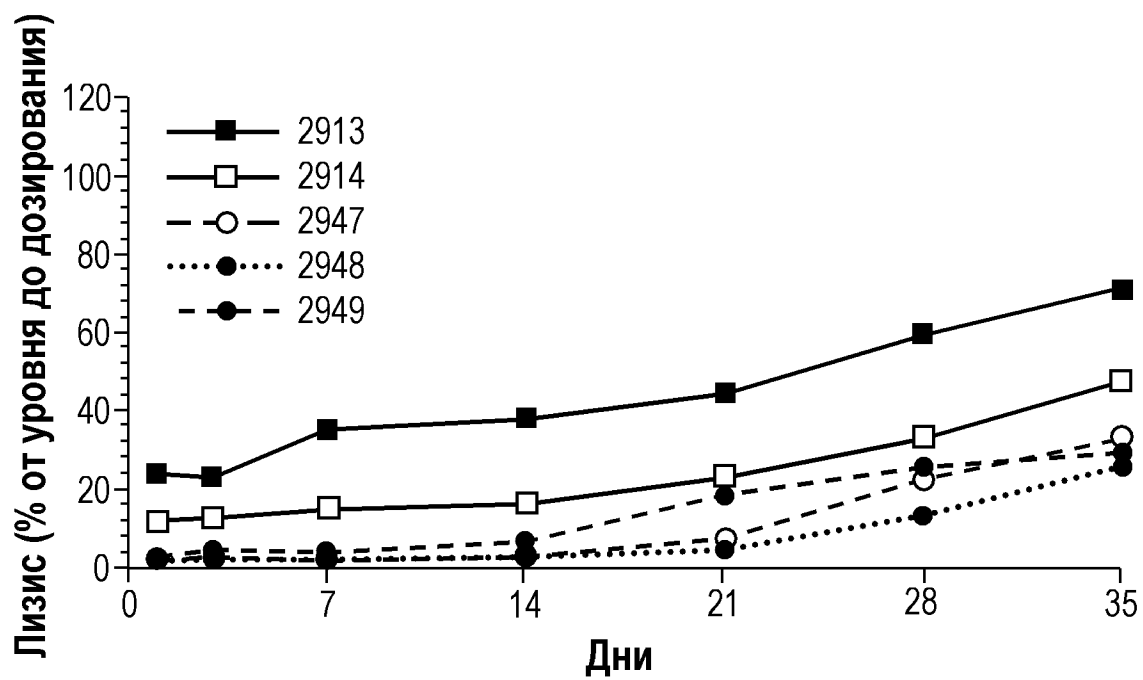
Фиг. 11А



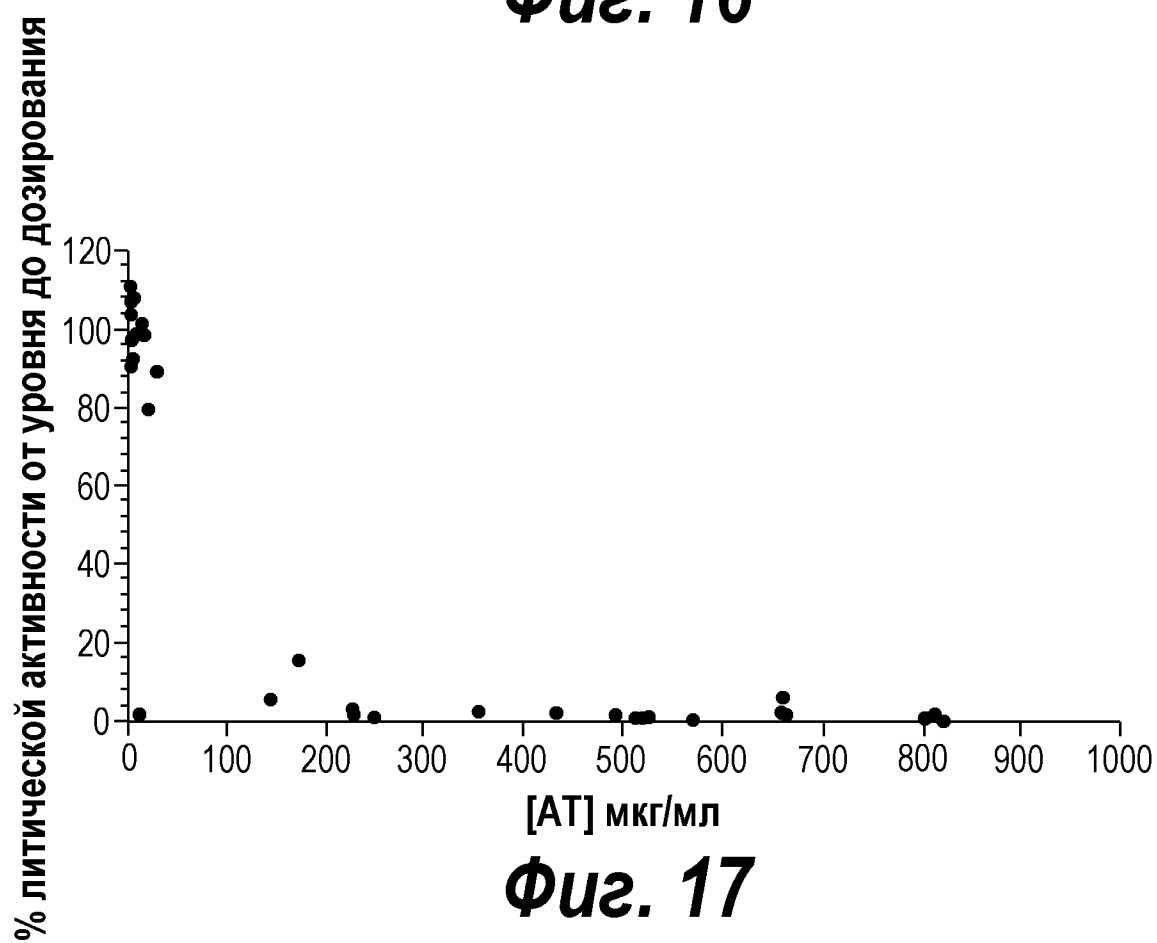
Фиг. 11В

**Фиг. 12****Фиг. 13**

**Фиг. 14****Фиг. 15**

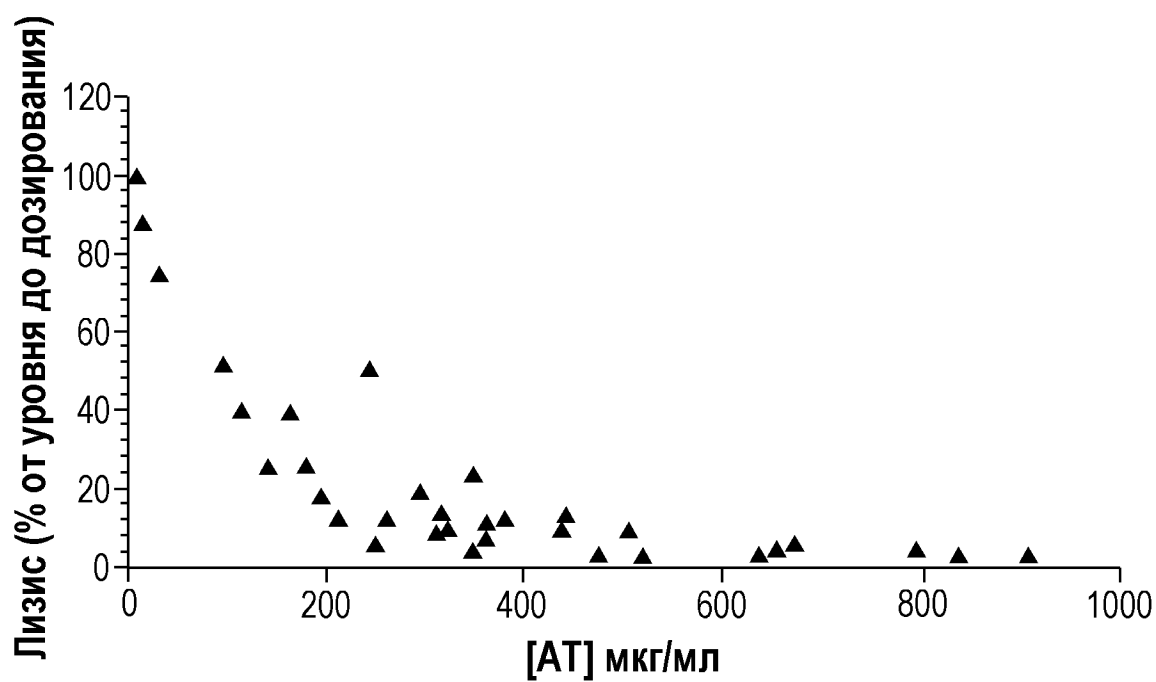


Фиг. 16

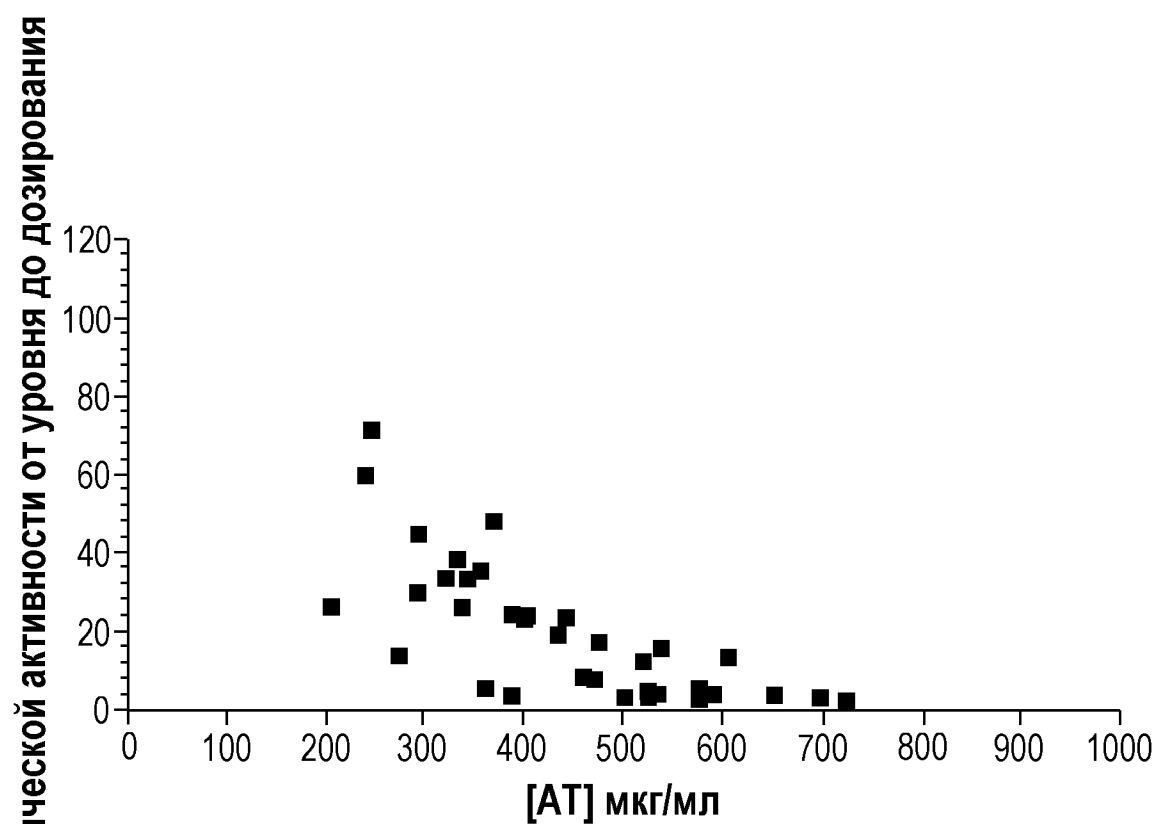


Фиг. 17

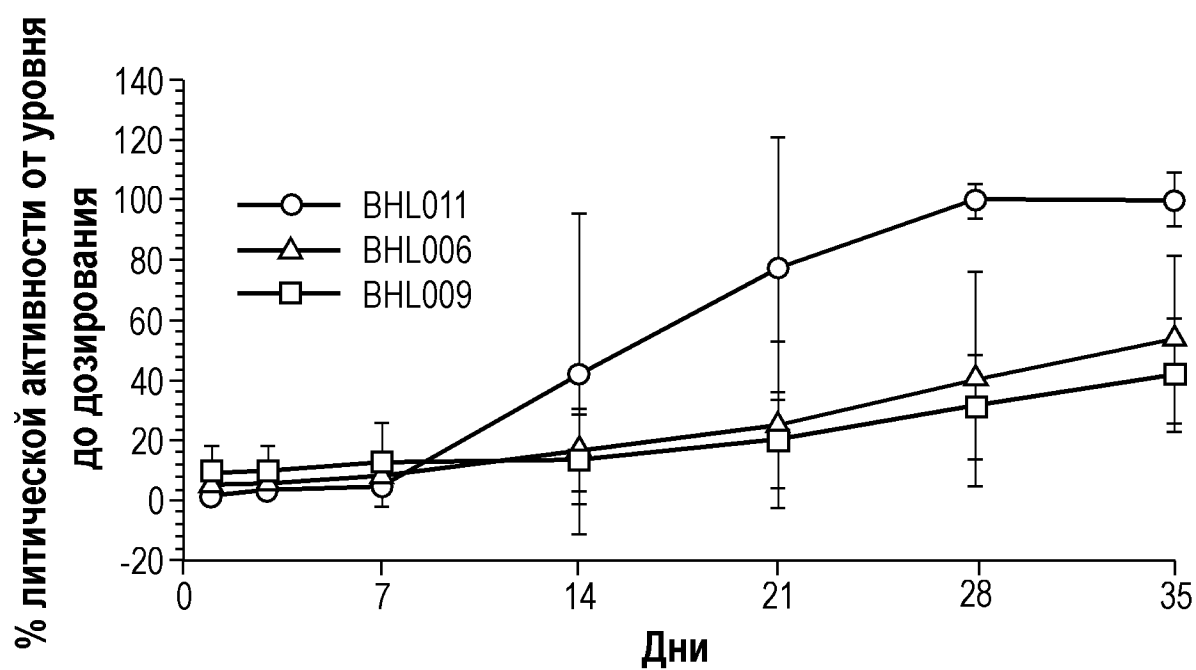
19/29

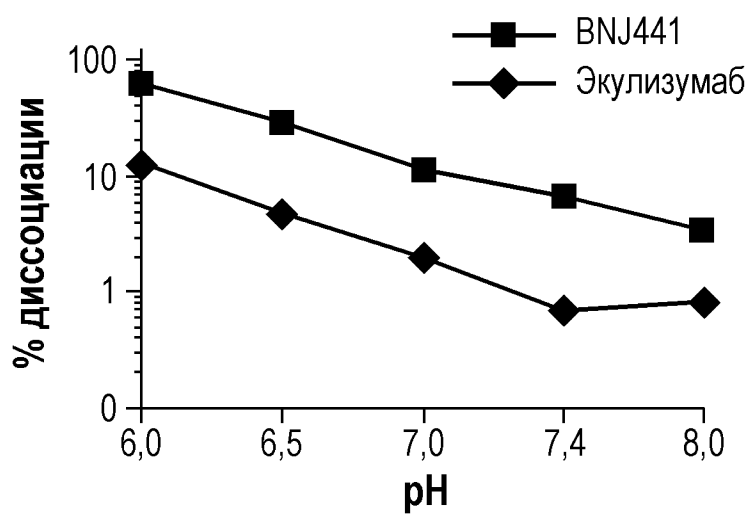
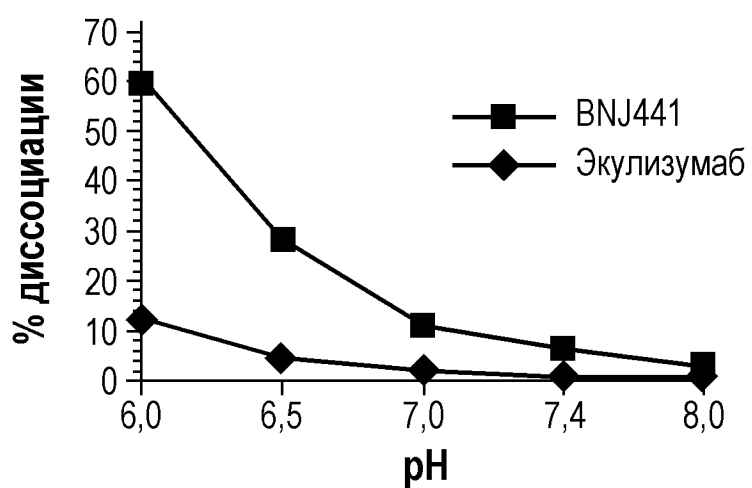


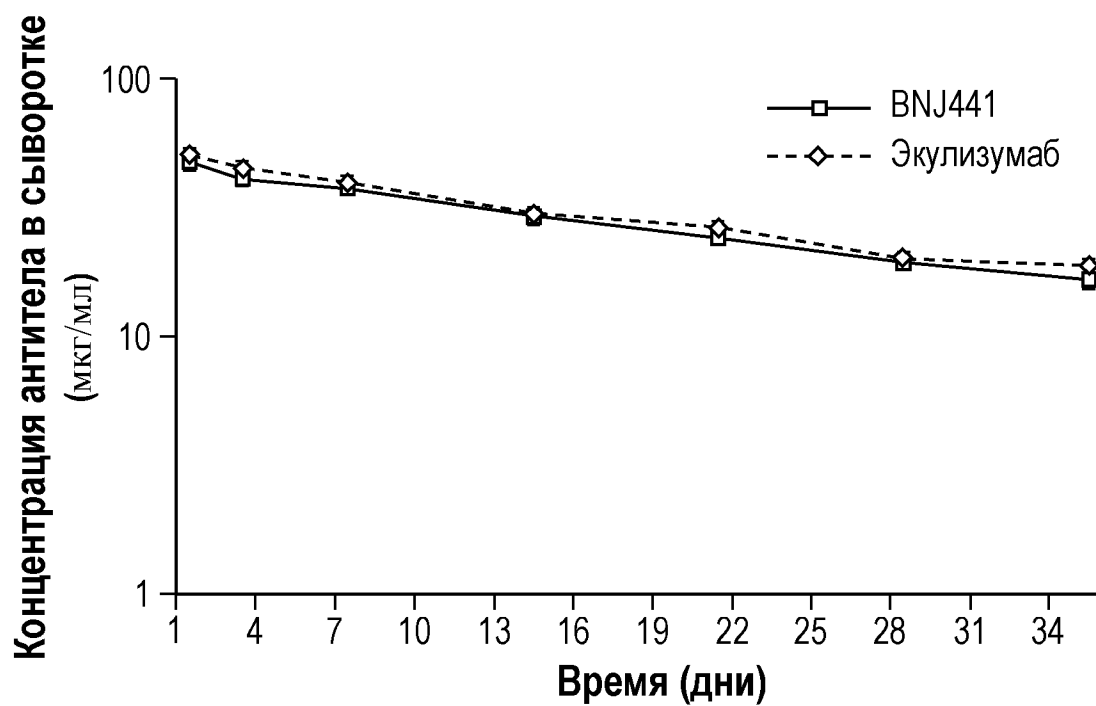
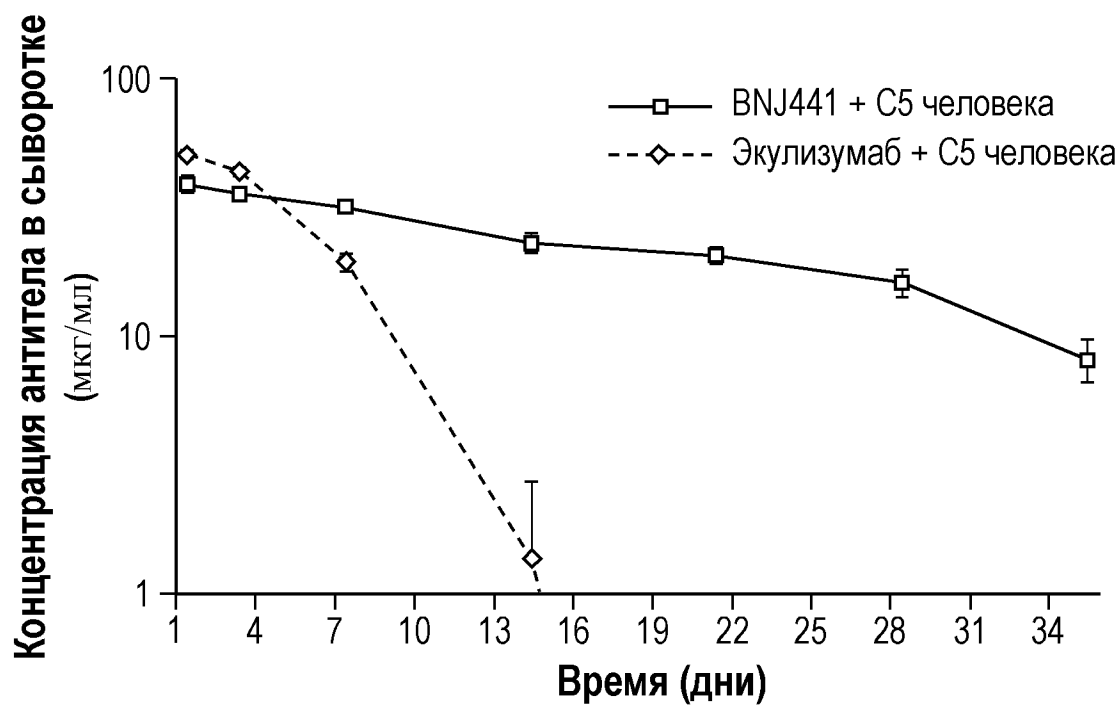
Фиг. 18



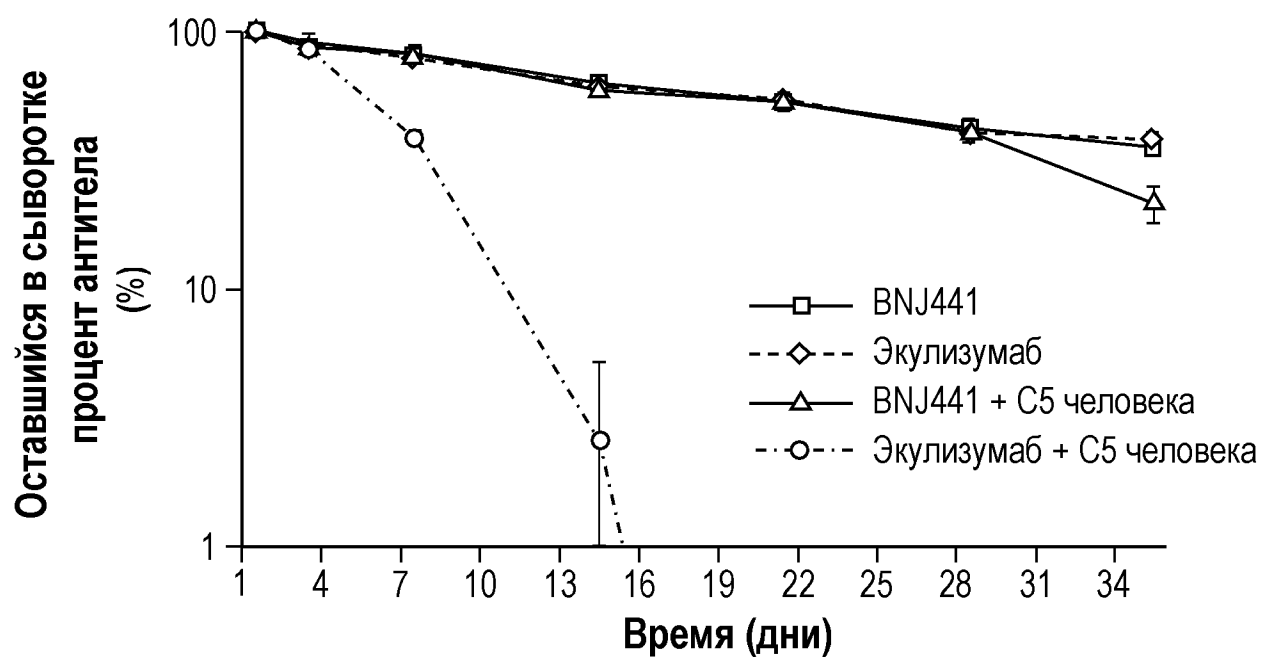
Фиг. 19

**Фиг. 20**

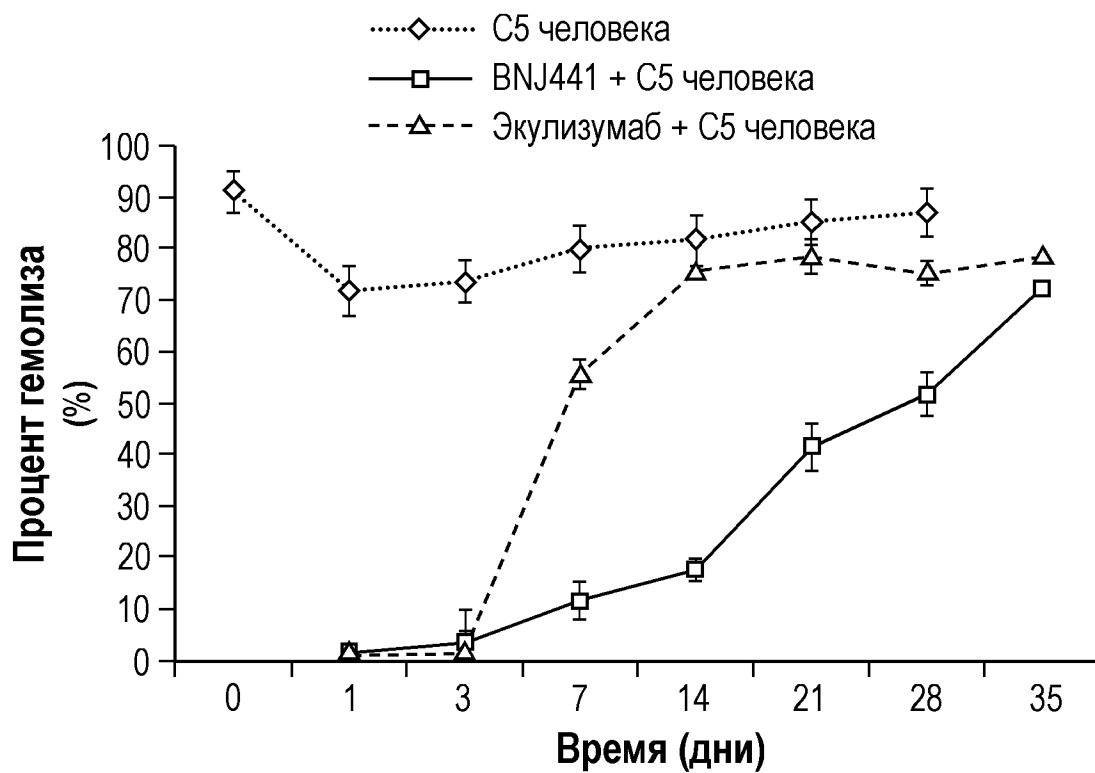
**Фиг. 21A****Фиг. 21B**

**Фиг. 22****Фиг. 23**

23/29

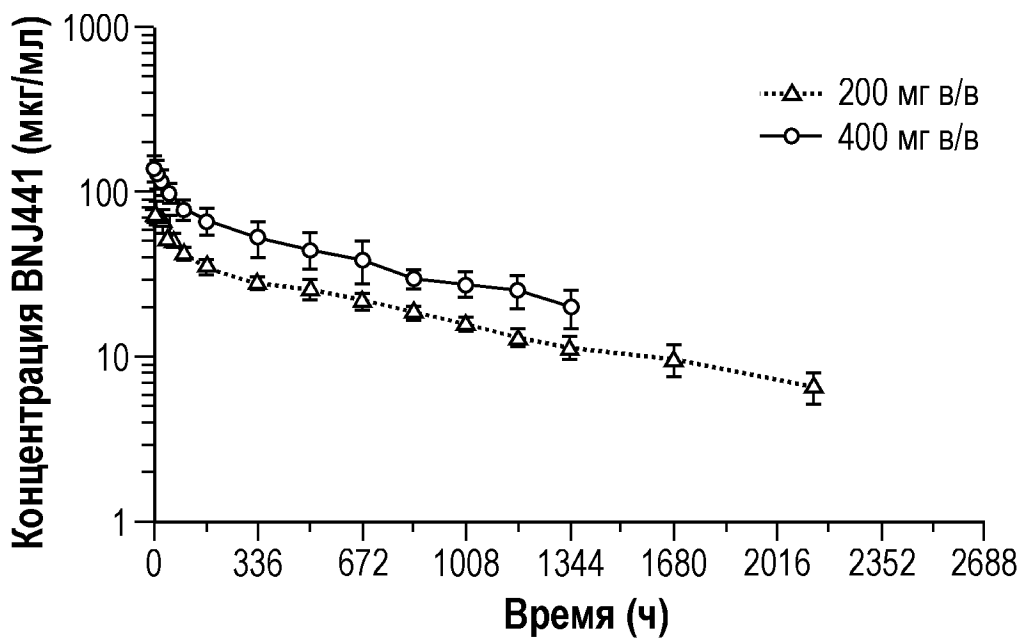
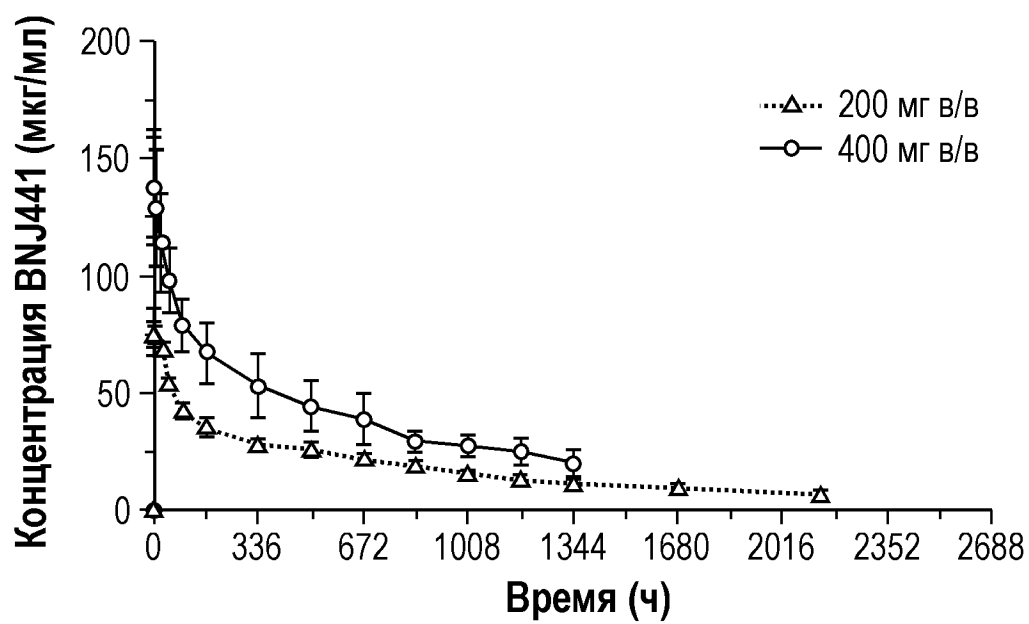


Фиг. 24

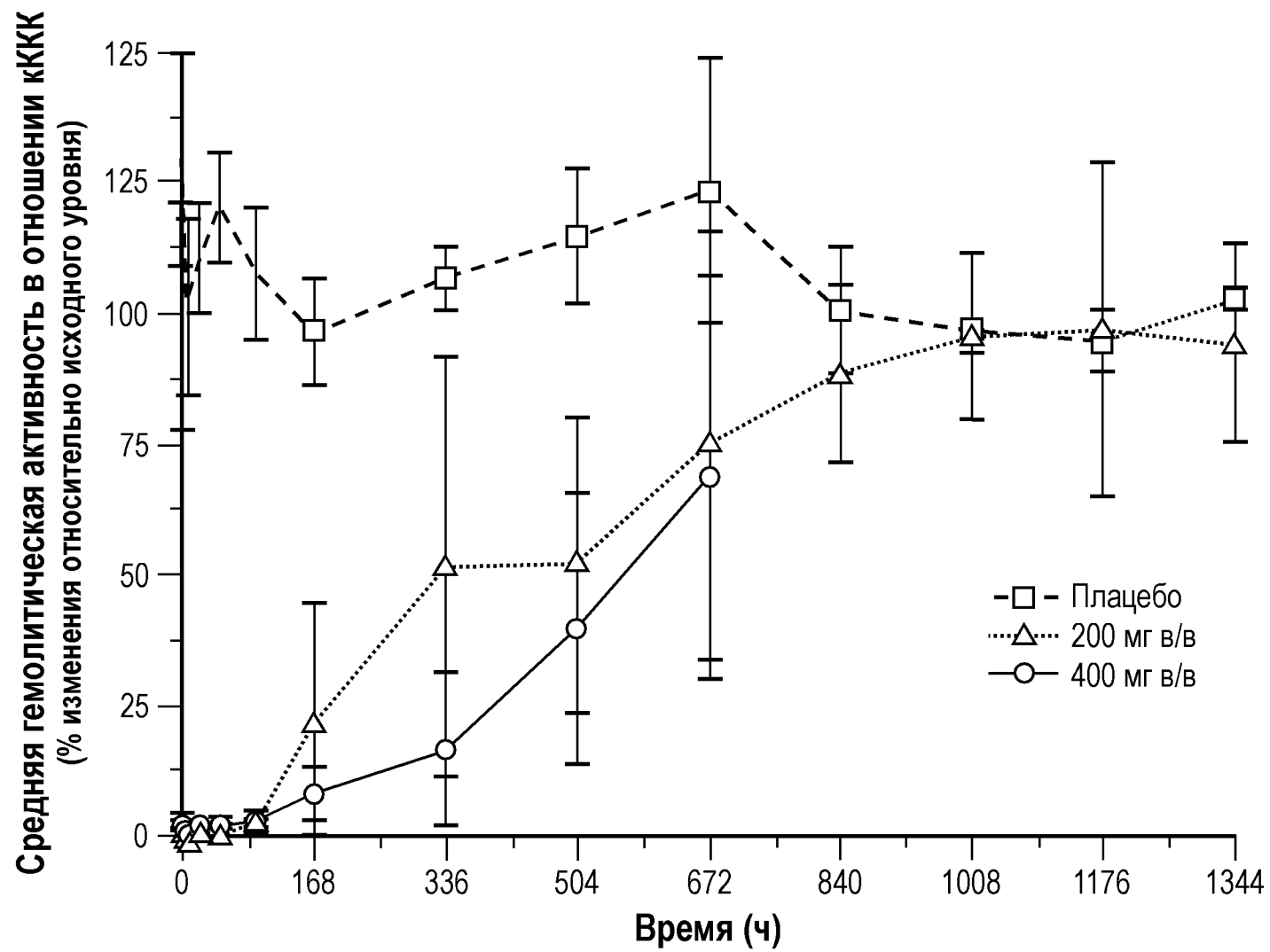


Фиг. 25

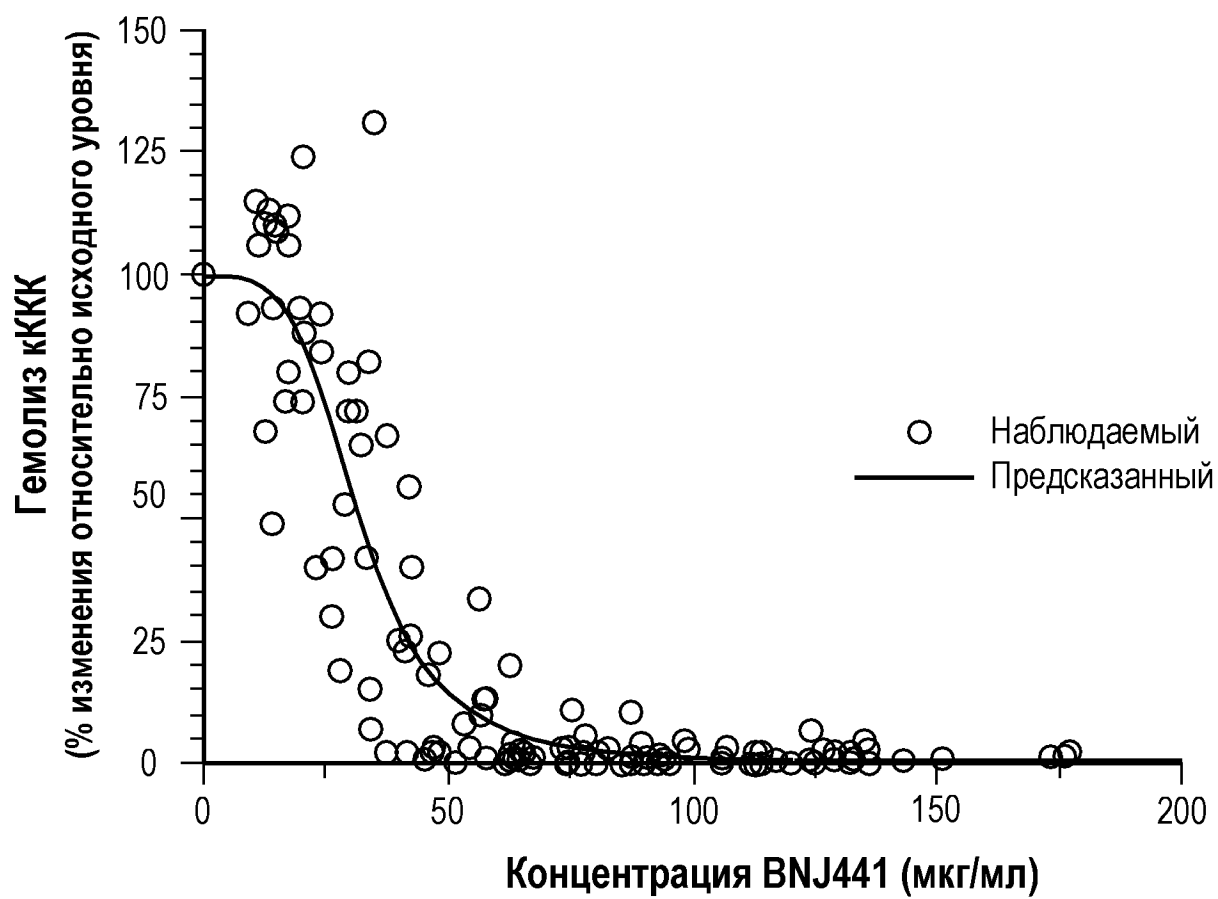
24/29

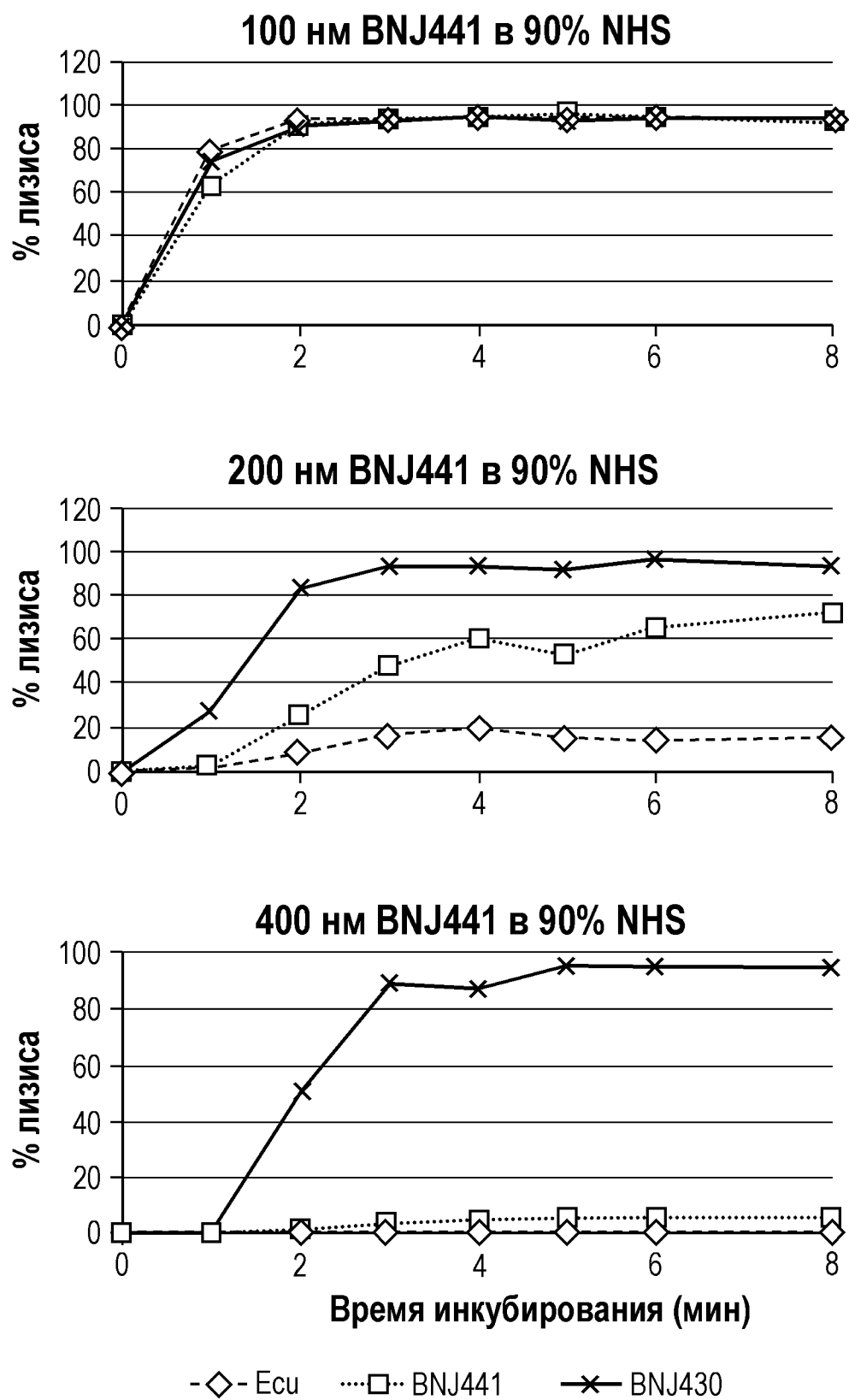


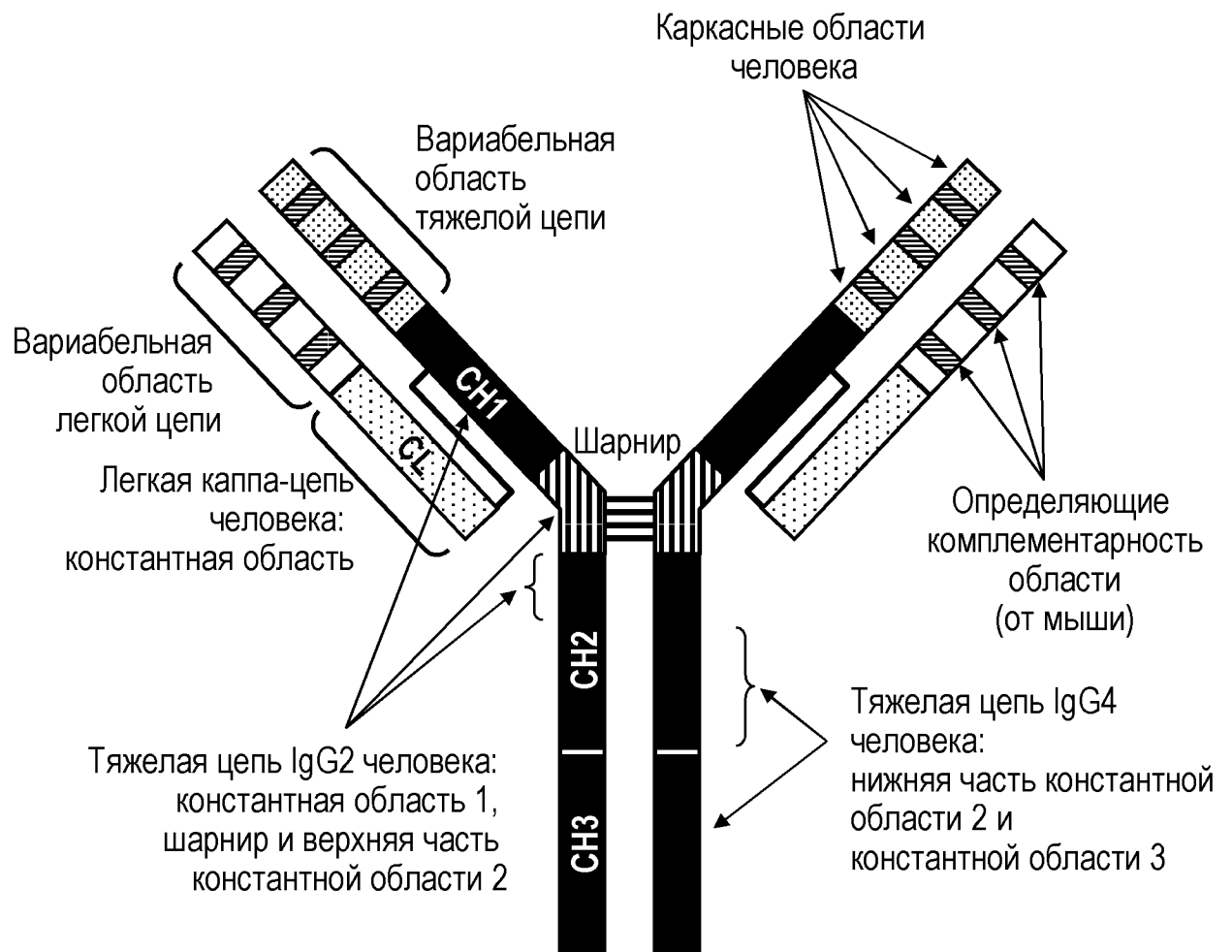
Фиг. 26



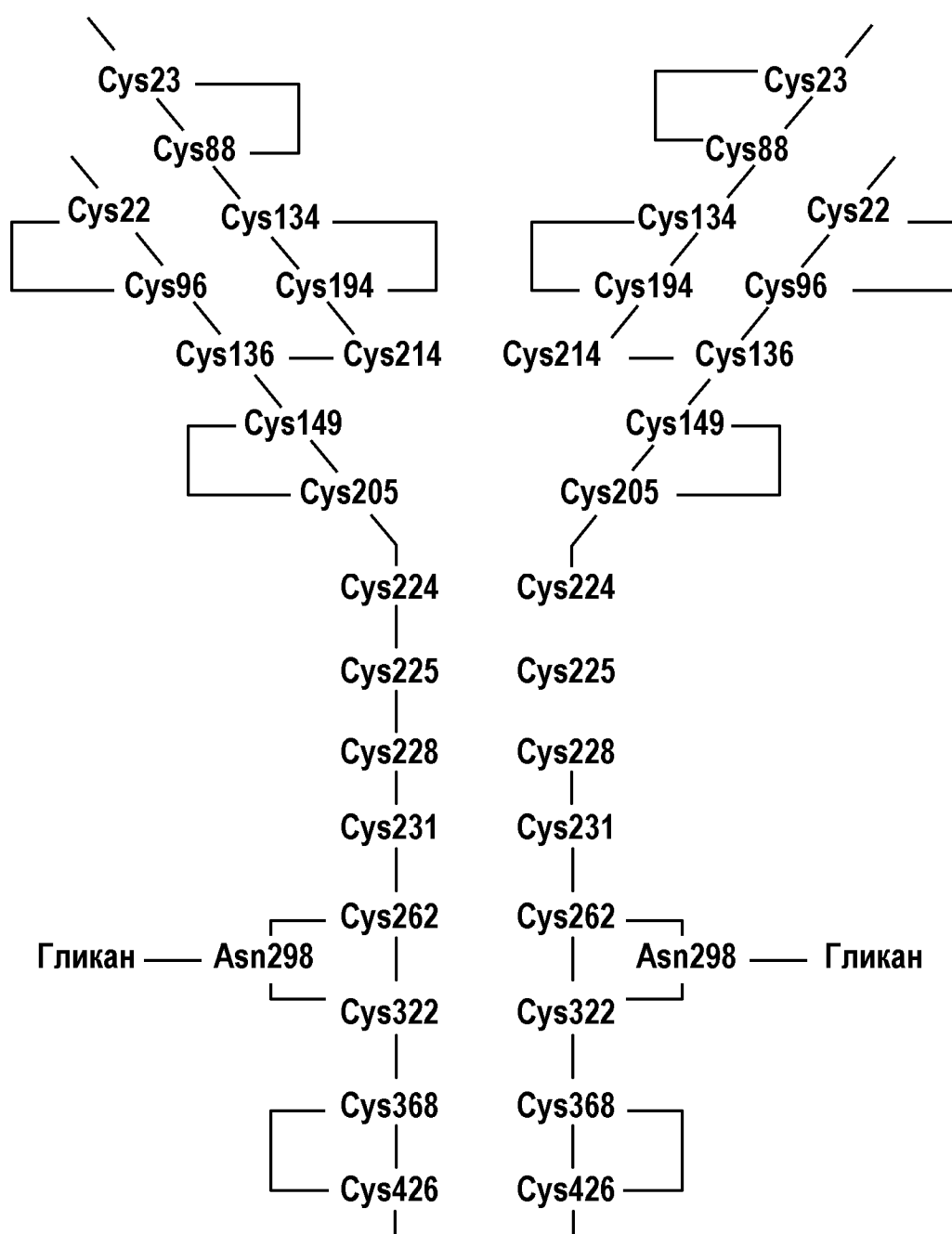
Фиг. 27

**Фиг. 28**

**Фиг. 29**



Фиг. 30

**Фиг. 31**