

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191658** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.03

(22) Дата подачи заявки
2019.12.13

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ ФАКТОРА С2В КОМПЛЕМЕНТА ЧЕЛОВЕКА И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/779,102

(32) 2018.12.13

(33) US

(86) РСТ/IB2019/060802

(87) WO 2020/121282 2020.06.18

(71) Заявитель:

АРДЖЕНКС БВБА (BE)

(72) Изобретатель:

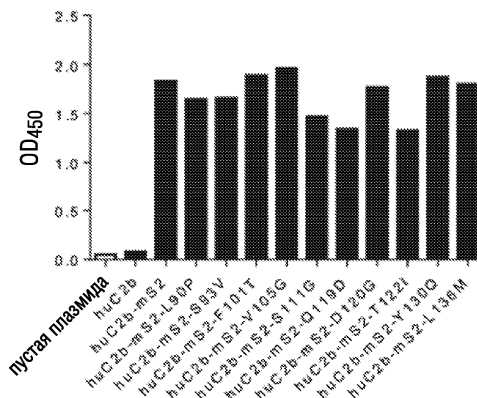
Бланхетот Кристоф (BE), Де Хард
Ханс (NL)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с фактором С2 комплемента человека и способны ингибировать активацию классического и лектинового путей системы комплемента. Антитела и антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют улучшенную технологичность, фармакокинетику и широкий охват антигенов. Также предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела и антигенсвязывающие фрагменты, нуклеиновые кислоты и векторы, кодирующие антитела и антигенсвязывающие фрагменты, клетки-хозяева, содержащие нуклеиновые кислоты или векторы, и способы получения и применения антител и антигенсвязывающих фрагментов. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для ингибирования классического пути активации комплемента у пациента, например человека. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты также можно использовать для ингибирования лектинового пути активации комплемента у пациента, например человека.

Анти-FLAG ИФА на мутантах точного картирования



A1

202191658

202191658

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-568851EA/019

АНТИТЕЛА ПРОТИВ ФАКТОРА С2В КОМПЛЕМЕНТА ЧЕЛОВЕКА И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

РОДСТВЕННАЯ ЗАЯВКА

Настоящая заявка испрашивает приоритет по временной заявке на патент США № 62/779,102, поданной 13 декабря 2018 г., содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который представлен в электронном виде в формате ASCII и включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Указанная копия ASCII, созданная 22 ноября 2019 г., называется 618634_AGX5-048PC_ST25.txt и имеет размер 94 329 байт.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области иммунологии и молекулярной биологии. Более конкретно, настоящее изобретение относится к композициям и способам ингибирования активации классического и лектинового путей системы комплемента и их применению при лечении заболеваний человека. В частности, изобретение относится к связывающим молекулам, которые связываются с фактором С2 комплемента человека, и способам их получения и применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Система комплемента включает каскадный ряд ферментов плазмы, регуляторных белков и белков, способных к клеточному лизису. Перед активацией различные факторы комплемента циркулируют в виде неактивных белков-предшественников. Активация системы приводит к каскаду активации, в котором один фактор активирует следующий за счет специфического протеолиза белка комплемента ниже по каскаду.

Активация системы комплемента может происходить тремя путями: классическим путем, альтернативным путем и лектиновым путем. Классический путь активируется взаимодействием антигена и антитела IgM, IgG1, IgG2 или IgG3 с образованием иммунных комплексов, которые связываются с C1q, субъединицей компонента комплемента C1. Альтернативный путь активируется иммунными комплексами, содержащими IgA, или распознаванием бактерий и других активирующих поверхностей. Лектиновый путь отвечает за независимый от антител путь активации комплемента, который инициируется связыванием маннан-связывающего лектина (MBL), также известного как маннозосвязывающий лектин или маннан-связывающий белок (MBP), с определенными углеводами на поверхности различных патогенов.

Активация классического пути начинается с последовательной активации C1, C4 и C2; C2, в свою очередь, расщепляется на C2a и C2b. Активация альтернативного пути начинается с последовательной активации компонентов комплемента D, C3 и B. Каждый путь расщепляет и активирует общий центральный компонент, C3 или третий фактор

комплемента, что приводит к активации общего терминального пути, ведущего к образованию мембраноатакующего комплекса (МАС, содержащий компоненты комплемента C5b-9; Muller-Eberhard, *Annu Rev Biochem* 1988, 57: 321). Во время активации комплемента генерируются несколько воспалительных пептидов, таких как анафилатоксины C3a и C5a, а также МАС. Эти продукты активации вызывают плейотропные биологические эффекты, такие как хемотаксис лейкоцитов, дегрануляция фагоцитарных клеток, тучных клеток и базофилов, сокращение гладких мышц, увеличение проницаемости сосудов и лизис клеток (Hugh, *Complement* 1986, 3: 111). Продукты активации комплемента также вызывают образование токсичных кислородных радикалов и синтез и высвобождение метаболитов арахидоновой кислоты и цитокинов, в частности, фагоцитами, что дополнительно усиливает воспалительный ответ.

Хотя комплемент является важной линией защиты от патогенных организмов, его активация также может нанести ущерб здоровым клеткам-хозяевам. Следовательно, считается, что ингибирование активации комплемента полезно для лечения и предотвращения опосредованного комплементом повреждения тканей. Соответственно, в данной области остается острая потребность в новых терапевтических средствах, которые ингибируют один или более ключевых компонентов каскада комплемента.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предложены новые моноклональные антитела против C2b человека и их антигенсвязывающие фрагменты с улучшенными характеристиками по сравнению с существующими антителами. Особенностью новых антител является делеция сайта гликозилирования в каркасной области 3 (FR3) вариабельного домена тяжелой цепи (VH). Примечательно, что новые антитела обеспечивают улучшенную гомогенность и, следовательно, улучшенную технологичность, а также неожиданно улучшенные функциональные свойства по сравнению с существующими антителами. Улучшенные функциональные свойства включают, например, повышенную pI и повышенный потенциал для так называемого широкого охвата антигенов. Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты найдут применение в терапии человека.

Аспектом изобретения является моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с фактором комплемента C2 человека, где указанное моноклональное антитело или его фрагмент содержит:

домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и

домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;

где аминокислотные остатки 72-74 (нумерация Kabat) домена VH состоят из $X_1X_2X_3$, соответственно, где X_2 представляет собой любую аминокислоту, а $X_1X_2X_3$ не является NX_2S или NX_2T .

Аспектом изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Аспектом изобретения является молекула нуклеиновой кислоты или множество молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению.

Аспектом изобретения является вектор или множество векторов, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты или множество молекул нуклеиновой кислоты по изобретению.

Аспектом изобретения является клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или множество молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению.

Аспектом изобретения является клетка-хозяин, содержащая вектор или множество векторов, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты или множество молекул нуклеиновой кислоты по изобретению.

Аспектом изобретения является способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, где способ включает культивирование популяции клеток по изобретению в условиях, допускающих экспрессию моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Аспектом изобретения является способ ингибирования активации классического или лектинового пути у пациента, включающий введение ему эффективного количества моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению.

Следующие ниже варианты осуществления применяются ко всем аспектам изобретения.

В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ состоит из DX_2S .

В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ состоит из DKS .

В некоторых вариантах осуществления домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит полноразмерное моноклональное антитело.

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело содержит константный домен тяжелой цепи человеческого IgG.

В некоторых вариантах осуществления константный домен тяжелой цепи содержит константный домен тяжелой цепи человеческого IgG1. В некоторых вариантах осуществления константный домен тяжелой цепи человеческого IgG1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления константный домен тяжелой цепи содержит константный домен тяжелой цепи человеческого IgG4. В некоторых вариантах

осуществления константный домен тяжелой цепи IgG4 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На Фиг. 1 изображен полиакриламидный гель с указанными образцами. Полосы с большей молекулярной массой для образцов на дорожках 4, 5, 8 и 9 (стрелки) показывают расщепление и сдвиг полосы для антител с VH3 и VH4.

Фиг. 2 представляет собой график, изображающий общие уровни указанных антител в течение 31 дня у яванских макаков. Были протестированы следующие антитела: BRO2-glyc-IgG4 (обезьяны 1 и 2, гликозилированная VH) и BRO2-IgG4 (обезьяны 5 и 6, негликозилированная VH).

Фиг. 3A-3I представляют собой графики, изображающие уровни свободного C2 (отражено на графике в виде OD 450 нм в зависимости от времени) в сыворотке в течение 31 дня после введения различных моноклональных антител яванским макакам. Были протестированы следующие антитела: BRO2-glyc-IgG4 (Фиг. 3A; обезьяны 1 и 2), отрицательный контроль (Фиг. 3B; обезьяны 3 и 4), BRO2-IgG4 (Фиг. 3C; обезьяны 5 и 6), BRO2-IgG4-NH (Фиг. 3D; обезьяны 7 и 8), BRO2-IgG1-LALA-NH (Фиг. 3E; ARGX-117; обезьяны 9 и 10), His1-IgG4 (Фиг. 3F; обезьяны 11 и 12), His1-IgG4-NH (Фиг. 3G; обезьяны 13 и 14), His1-IgG1-LALA-NH (Фиг. 3H; обезьяны 15 и 16) и His2-IgG4 (Фиг. 3I; обезьяны 17 и 18).

Фиг. 4 представляет собой график, изображающий средние уровни свободного C2 (отражено на графике в виде OD 450 нм в зависимости от времени) в сыворотке в течение 31 дня у яванских макаков, которым вводили различные указанные моноклональные антитела.

Фиг. 5 представляет собой график, изображающий уровни свободного C2 (отражено на графике в виде OD 450 нм в зависимости от времени) в сыворотке яванских макаков, обработанных указанными негликозилированными антителами.

Фиг. 6A-6D представляют собой серию графиков, изображающих уровни свободного C2 (отражено на графике в виде OD 450 нм) у яванских макаков, определенные в указанные моменты времени до или после введения антител. Обезьяны те же, как на Фиг. 3A-3I. Фиг. 6A, сравнение уровня до обработки и до обработки плюс 500 мг/мл BRO-2; Фиг. 6B, 4 часа против 1 дня; Фиг. 6C, 4 часа против 2 дней; Фиг. 6D, день 11 по сравнению с днем 27. ADA, антитела против лекарственного средства.

Фиг. 7A-7P представляют собой серию графиков, изображающих иммуногенность (отражено на графике в виде OD 450 нм) антител против C2 или моноклональных антител

отрицательного контроля, вводимых яванским макакам, в течение 30 дней. Обезьяны те же, как на Фиг. 3А-3І. Фиг. 7А, обезьяна 1; Фиг. 7В, обезьяна 2; Фиг. 7С, обезьяна 5; Фиг. 7D, обезьяна 6; Фиг. 7Е, обезьяна 7; Фиг. 7F, обезьяна 8; Фиг. 7G, обезьяна 9; Фиг. 7H, обезьяна 10; Фиг. 7I, обезьяна 11; Фиг. 7J, обезьяна 12; Фиг. 7K, обезьяна 13; Фиг. 7L, обезьяна 14; Фиг. 7M, обезьяна 15; Фиг. 7N, обезьяна 16; Фиг. 7O, обезьяна 17; Фиг. 7P, обезьяна 18.

На Фиг. 8А-8F представляет собой серию графиков, изображающих иммуногенность (отражено на графике в виде OD 450 нм с течением времени) в течение 60 дней моноклональных антител против C2, вводимых яванским макакам. Обезьяны те же, как на Фиг. 3А-3І. Фиг. 8А, обезьяна 5; Фиг. 8В, обезьяна 6; Фиг. 8С, обезьяна 9; Фиг. 8D, обезьяна 10; Фиг. 8Е, обезьяна 15; Фиг. 8F, обезьяна 16. ADA, антитела против лекарственного средства.

На Фиг. 9А-9D изображено связывание ARGX-117 с C2, которое оценивали с помощью вестерн-блот-анализа и поверхностного плазмонного резонанса (SPR). На Фиг. 9А изображен вестерн-блот-анализ сыворотки с ARGX-117 (репрезентативный результат): дорожка 1: маркер размера MW; Дорожка 2: контроль рекомбинантного человеческого C2 (размер примерно 100 кДа); Дорожка 3: сыворотка; Дорожка 4: индукция активации комплемента путем добавления агрегированного IgG к сыворотке и инкубации при 37 °C; Дорожка 5: C2-дефицитная сыворотка.

На Фиг. 9В изображен анализ SPR с иммобилизованным на чипе C2 и различными Fab-фрагментами ARGX-117 в качестве элюата.

На Фиг. 9С изображен анализ SPR с биотин-С4b, иммобилизованным на чипе со стрептавидином, и человеческим C2 с моноклональными антителами и без них в качестве элюата; черный: без предварительной инкубации; серый: анти-FXI; контрольное mAb IgG4 человека; бирюзовый: не ингибирующий клон анти-C2 анти-C2-63, т.е. клон 63, распознающий большую субъединицу C2 (C2a); красный: ARGX-117; все при молярных отношениях 5:1; кривые нормализовали к сигналу непосредственно перед инъекцией C2 на чипы С4b.

На Фиг. 9D изображен анализ SPR с биотин-С4b, иммобилизованным на чипе со стрептавидином, и последовательно с человеческими C2 и mAb в качестве элюата; черный: рабочий буфер; серый: анти-FXI; контрольное mAb человеческого IgG4; бирюзовый: не ингибирующий клон анти-C2 анти-C2-63; красный: ARGX-117; кривые нормализовали непосредственно перед добавлением mAb.

На Фиг. 10 схематически изображены мутанты с обменом доменов между C2 (SEQ ID NO: 21) и фактором комплемента В (FB) (SEQ ID NO: 50). В обоих белках небольшой фрагмент (C2b в комплементе C2; SEQ ID NO: 44 или FBa в факторе комплемента В; SEQ ID NO: 51) состоит из трех доменов Sushi (или контрольного белка комплемента (CCP)), тогда как большой фрагмент состоит из домена фактора фон Виллебранда типа А (VWFА) и домена пептидазы S1. Обратите внимание, что последовательности между отдельными доменами не были захвачены вместе с этими мутантами, но также могут состоять из эпитопов. Дополнительные последовательности включают C2a, SEQ ID NO: 43; C2b S1,

SEQ ID NO: 45; C2b S2, SEQ ID NO: 46; C2b S3, SEQ ID NO: 47; C2 VWFA, SEQ ID NO: 48; C2-пептидазу S1, SEQ ID NO: 49; FBb, SEQ ID NO: 52; FBa S1, SEQ ID NO: 53; FBa S2, SEQ ID NO: 54; FBa S3, SEQ ID NO: 55; FB VWFA, SEQ ID NO: 56; и пептидазу 1 FB, SEQ ID NO: 57.

На Фиг.11 изображены результаты, полученные с помощью ИФА против FLAG, выполненного на мутантах с обменом доменов. Для покрытия использовали пятикратно разведенные супернатанты трансфецированных клеток HEK293, а для детектирования использовали мышинные моноклональные антитела против FLAG в комбинации с меченым HRP антимышиным IgG.

На Фиг. 12 изображены результаты, полученные с помощью ИФА с обменом доменов, выполненного с антителом против C2-5F2.4. Для покрытия использовали mAb против C2-5F2.4 (человеческий IgG4 S241P VH4/VL3 LC-13/03-163A Bioceros), планшеты инкубировали с 20-кратно разведенным супернатантом трансфектантов HEK293, и связывание определяли с помощью антитела против FLAG. Репрезентативные результаты двух независимых экспериментов с аналогичным результатом.

На Фиг. 13 изображено выравнивание аминокислотной последовательности домена Sushi 2 (S2) C2b человека и мыши. S2 человека, SEQ ID NO: 46; S2 мыши, SEQ ID NO: 58. Звездочки указывают идентичность последовательности.

На Фиг. 14 изображены результаты, полученные с помощью ИФА против FLAG на мутантах с точным картированием. Неразбавленные супернатанты трансфецированных клеток HEK293 использовали для покрытия, а меченые биотином мышинные моноклональные антитела против FLAG в комбинации с HRP-меченым конъюгатом SA использовали для детектирования.

На Фиг. 15 изображены результаты мутантов точного картирования. Для покрытия использовали mAb против C2-5F2.4 (человеческий IgG4 S241P VH4/VL3 LC-13/03-163A Bioceros), планшеты инкубировали с 20-кратно разведенным супернатантом трансфектантов HEK293, и связывание определяли с помощью антитела против FLAG.

На Фиг. 16 изображен план кластерного картирования мутантов с использованием трех аминокислотных мутаций для каждого кластера, местоположения для которых указаны жирным шрифтом в последовательности человека. Каждую человеческую последовательность мутировали для замены человеческой аминокислоты, выделенной жирным шрифтом, соответствующей мышиной аминокислотой. S2 человека, SEQ ID NO: 46; S2 мыши, SEQ ID NO: 58. Звездочки указывают идентичность последовательности.

На Фиг. 17A и 17B изображен ИФА против FLAG на мутантах с кластерным картированием. На Фиг. 17A изображены пятикратно разведенные супернатанты трансфецированных клеток HEK293, которые использовали для покрытия, и мышинные моноклональные антитела против FLAG в комбинации с HRP-мечеными антителами против мышинового IgG в качестве детектирования. GFP, зеленый флуоресцентный белок.

На Фиг. 17B изображено связывание антитела против C2-5F2.4 с кластерными мутантами. MAb против C2-5F2.4 (человеческий IgG4 S241P VH4/VL3, LC-13/03-163A,

Biosceros) использовали в качестве покрытия, планшеты инкубировали с 20-кратно разведенным супернатантом трансфектантов НЕК293, и связывание определяли с помощью антитела против FLAG. GFP, зеленый флуоресцентный белок.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Определения

«Антитело» или «иммуноглобулин» - Используемый в настоящем описании термин «иммуноглобулин» включает полипептид, имеющий комбинацию двух тяжелых и двух легких цепей, независимо от того, обладает ли он какой-либо соответствующей специфической иммунореактивностью. Используемый в настоящем описании термин «антитело» относится к таким упорядоченным структурам, которые обладают значительной специфической иммунореактивной активностью в отношении интересующего антигена (например, комплекса белков комплемента, включая C2). Термин «C2-антитела» используется в настоящем описании для обозначения антител, которые проявляют иммунологическую специфичность в отношении комплекса белков комплемента, включая C2, в частности, белка C2 человека и доменов, которые образуются в результате расщепления C2, и в некоторых случаях его гомологичных видов. Антитела и иммуноглобулины содержат легкие и тяжелые цепи с ковалентной межцепочечной связью между ними или без нее. Основные структуры иммуноглобулинов в системах позвоночных относительно хорошо изучены.

Биохимически можно выделить пять различных классов антител (IgG, IgM, IgA, IgD и IgE). Все пять классов антител входят в объем настоящего изобретения. Следующее обсуждение в основном будет относиться к классу молекул иммуноглобулинов IgG. Что касается IgG, иммуноглобулины обычно содержат две идентичные легкие полипептидные цепи с молекулярной массой приблизительно 23000 Дальтон и две идентичные тяжелые цепи с молекулярной массой 53000-70000. Четыре цепи соединены дисульфидными связями в конфигурации «Y», в которой легкие цепи соединяют тяжелые цепи, начиная с раскрыва «Y» и продолжаясь через вариабельную область.

Легкие цепи антитела классифицируются или как каппа (κ) или лямбда (λ). Каждый класс тяжелой цепи может быть связан с легкой цепью каппа или лямбда. В общем, легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, а «хвостовые» части двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, когда иммуноглобулины генерируются либо гибридами, В клетками или генетически сконструированными клетками-хозяевами. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности проходят от N-конца на раздвоенных концах Y-конфигурации до C-конца внизу каждой цепи. Специалистам в данной области понятно, что тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон (γ , μ , α , δ или ϵ), включая некоторые подклассы среди них (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Природа этой цепи определяет «класс» антитела как IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и т. д., хорошо охарактеризованы и, как известно, придают функциональную специализацию.

Модифицированные версии каждого из этих классов и изотипов легко различимы для квалифицированного специалиста с учетом настоящего описания и, соответственно, находятся в пределах объема настоящего изобретения.

Как указано выше, переменная область антитела позволяет антителу избирательно распознавать и специфически связываться с эпитопами на антигенах. То есть домен VL и домен VH антитела объединяются с образованием переменной области, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий сайт. Эта четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт, присутствующий на конце каждого плеча Y. Более конкретно, антигенсвязывающий сайт определяется тремя областями, определяющими комплементарность (CDR), на каждой из цепей VH и VL.

«Связывающая молекула» - Используемый в настоящем описании термин «связывающая молекула» является общим термином, предназначенным для охвата антител и их антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с настоящим описанием.

«Сайт связывания» - Используемый в настоящем описании термин «сайт связывания» включает область полипептида, которая отвечает за селективное связывание с интересующим антигеном-мишенью. Связывающие домены содержат по меньшей мере один сайт связывания. Примеры связывающих доменов включают переменный домен антитела. Молекулы антител по изобретению могут содержать один сайт связывания или несколько (например, два, три или четыре) сайта связывания.

«Переменная область» или «переменный домен» - термин «переменный» относится к тому факту, что определенные части переменных доменов VH и VL сильно различаются по последовательности среди антител и используются для связывания и специфичности каждого конкретного антитела в отношении его антигена-мишени. Однако переменность не распределена равномерно по переменным доменам антител. Он сконцентрирован в трех сегментах, называемых «гиперпеременные петли», в каждом из домена VL и домена VH, которые образуют часть антигенсвязывающего сайта. Первая, вторая и третья гиперпеременные петли домена легкой цепи VLambda обозначаются в настоящем описании как L1 (λ), L2 (λ) и L3 (λ) и могут быть определены как содержащие остатки 24-33 (L1 (λ), состоящая из 9, 10 или 11 аминокислотных остатков), 49-53 (L2 (λ), состоящая из 3 остатков) и 90-96 (L3 (λ), состоящая из 5 остатков) в домене VL (Morea et al., Methods 20: 267-279 (2000)). Первая, вторая и третья гиперпеременные петли домена легкой цепи Vкаппа обозначаются в настоящем описании как L1 (κ), L2 (κ) и L3 (κ) и могут быть определены как содержащие остатки 25-33 (L1 (κ), состоящая из 6, 7, 8, 11, 12 или 13 остатков), 49-53 (L2 (κ), состоящая из 3 остатков) и 90-97 (L3 (κ), состоящая из 6 остатков) в домене VL (Morea et al., Methods 20: 267-279 (2000)). Первая, вторая и третья гиперпеременные петли домена VH обозначаются в настоящем описании как H1, H2 и H3 и могут быть определены как содержащие остатки 25-33 (H1, состоящая из 7, 8 или 9 остатков), 52-56 (H2, состоящая из 3 или 4 остатков) и 91-105 (H3, высокопеременная по длине) в домене VH (Morea et al., Methods 20: 267-279 (2000)).

Если не указано иное, термины L1, L2 и L3, соответственно, относятся к первой,

второй и третьей гипервариабельным петлям домена VL и охватывают гипервариабельные петли, полученные как из изоформ V κ appa, так и V λ mbda. Термины H1, H2 и H3, соответственно, относятся к первой, второй и третьей гипервариабельным петлям домена VH и охватывают гипервариабельные петли, полученные из любого из известных изоформ тяжелой цепи, включая γ , μ , α , δ или ϵ .

Каждая гипервариабельная петля L1, L2, L3, H1, H2 и H3 может содержать часть «области, определяющей комплементарность», или «CDR», как определено ниже. Термины «гипервариабельная петля» и «область, определяющая комплементарность», не являются строго синонимичными, поскольку гипервариабельные петли (HV) определяются на основе структуры, тогда как области, определяющие комплементарность, (CDR), определяются на основе изменчивости последовательности (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1983), а пределы HV и CDR могут отличаться в некоторых доменах VH и VL.

CDR доменов VL и VH обычно можно определить как содержащие следующие аминокислоты: остатки 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в вариабельном домене легкой цепи и остатки 31 -35 или 31-35b (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в вариабельном домене тяжелой цепи; (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Таким образом, HV могут содержаться в соответствующих CDR, и ссылки в данном документе на «гипервариабельные петли» доменов VH и VL следует интерпретировать также как охватывающие соответствующие CDR, и наоборот, если не указано иное.

Более высококонсервативные части вариабельных доменов называются каркасной областью (FR), как определено ниже. Каждый из вариабельных доменов нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре FR (FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно), в значительной степени принимающих конфигурацию β -листов, связанных тремя гипервариабельными петлями. Гипервариабельные петли в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости от FR и с гипервариабельными петлями из другой цепи вносят вклад в образование антигенсвязывающего сайта антител. Структурный анализ антител выявил взаимосвязь между последовательностью и формой сайта связывания, образованного областями, определяющими комплементарность (Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 227: 799-817 (1992)); Tramontano et al., *J. Mol. Biol.* 215: 175-182 (1990)). Несмотря на высокую вариабельность последовательностей, пять из шести петель принимают лишь небольшой репертуар конформаций основной цепи, называемых «каноническими структурами». Эти конформации определяются, во-первых, длиной петель, а во-вторых, наличием ключевых остатков в определенных положениях в петлях и в каркасных областях, которые определяют конформацию через их упаковку, водородные связи или способность принимать необычные конформации основной цепи.

«Каркасная область» - Термин «каркасная область» или «FR область», используемый в настоящем описании, включает аминокислотные остатки, которые являются частью вариабельной области, но не являются частью CDR (например, с

использованием определения CDR по Kabat). Следовательно, каркас вариабельной области имеет длину примерно 100-120 аминокислот, но включает только те аминокислоты, которые не входят в CDR. Для конкретного примера вариабельного домена тяжелой цепи и для CDR, как определено Kabat et al., каркасная область 1 соответствует домену вариабельной области, охватывающему аминокислоты 1-30; каркасная область 2 соответствует домену вариабельной области, охватывающему аминокислоты 36-49; каркасная область 3 соответствует домену вариабельной области, охватывающему аминокислоты 66-94, а каркасная область 4 соответствует домену вариабельной области от аминокислоты 103 до конца вариабельной области. Каркасные области легкой цепи аналогично разделяются каждой из CDR вариабельной области легкой цепи. Аналогичным образом, используя определение CDR Chothia et al. или McCallum et al., границы каркасной области разделены соответствующими концами CDR, как описано выше. В предпочтительных вариантах осуществления CDR определены Kabat.

Во встречающихся в природе антителах шесть CDR, присутствующие на каждом мономерном антителе, представляют собой короткие несмежные последовательности аминокислот, которые специфически расположены с образованием антигенсвязывающего сайта, поскольку антитело принимает свою трехмерную конфигурацию в водной среде. Остальные вариабельные домены тяжелой и легкой цепи демонстрируют меньшую межмолекулярную вариабельность в аминокислотной последовательности и называются каркасными областями. Каркасные области в основном принимают конформацию β -листов, а CDR образуют петли, которые соединяют и в некоторых случаях образуют часть структуры β -листов. Таким образом, эти каркасные области действуют, образуя каркас, который обеспечивает правильную ориентацию шести CDR за счет межцепочечных нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий сайт, образованный расположенными CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу на иммунореактивном антигене. Эта комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с иммунореактивным эпитопом антигена. Положение CDR может легко определить специалист в данной области.

«Негликозилированный» - Используемый в настоящем описании термин «негликозилированный» относится к форме антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в которой отсутствует гликозилирование в потенциальном сайте гликозилирования в антителе или антигенсвязывающем фрагменте. В некоторых вариантах осуществления термин «негликозилированный» относится к форме антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в которой отсутствует гликозилирование в потенциальном N-связанном сайте гликозилирования в антителе или антигенсвязывающем фрагменте. В некоторых вариантах осуществления термин «негликозилированный» относится к форме антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в котором отсутствует гликозилирование в потенциальном сайте N-связанного гликозилирования в вариабельной области тяжелой цепи.

«Константная область» - Используемый в настоящем описании термин «константная

область» относится к части молекулы антитела за пределами вариабельных доменов или вариабельных областей. Легкие цепи иммуноглобулина имеют однодоменную «константную область», обычно называемую «доменом CL или CL1». Этот домен лежит на С-конце по отношению к домену VL. Тяжелые цепи иммуноглобулина различаются по своей константной области в зависимости от класса иммуноглобулина (γ , μ , α , δ , ϵ). Тяжелые цепи γ , α и δ имеют константную область, состоящую из трех иммуноглобулиновых доменов (называемых CH1, CH2 и CH3) с гибкой шарнирной областью, разделяющей домены CH1 и CH2. Тяжелые цепи μ и ϵ имеют константную область, состоящую из четырех доменов (CH1-CH4). Константные домены тяжелой цепи расположены на С-конце по отношению к домену VH.

Нумерация аминокислот в тяжелой и легкой цепях иммуноглобулина проходит от N-конца на разветвленных концах Y-конфигурации до С-конца в нижней части каждой цепи. Для определения константных доменов тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина используются разные схемы нумерации. В соответствии со схемой нумерации EU константные домены тяжелой цепи молекулы IgG идентифицируются следующим образом: CH1 - аминокислотные остатки 118-215; CH2 - аминокислотные остатки 231-340; CH3 - аминокислотные остатки 341-446. «Шарнирная область» включает часть молекулы тяжелой цепи, которая соединяет домен CH1 с доменом CH2. Эта шарнирная область состоит приблизительно из 25 остатков и является гибкой, что позволяет двум N-концевым антигенсвязывающим областям двигаться независимо. Шарнирные области можно разделить на три отдельных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены (Roux K.H. et al. J. Immunol. 161: 4083-90 1998). Антитела по изобретению, содержащие «полностью человеческую» шарнирную область, могут содержать одну из последовательностей шарнирной области, показанных в Таблице 1 ниже.

Таблица 1. Человеческие шарнирные последовательности

IgG	Верхний шарнир	Средний шарнир	Нижний шарнир
IgG1	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:9)	CPPCP (SEQ ID NO:10)	APELLGGP (SEQ ID NO:11)
IgG2	ERK (SEQ ID NO:12)	CCVECPPPCP (SEQ ID NO:13)	APPVAGP (SEQ ID NO:14)
IgG3	ELKTPGLDTHHT (SEQ ID NO:15)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₃ (SEQ ID NO:16)	APELLGGP (SEQ ID NO:17)
IgG4	ESKYGPP (SEQ ID NO:18)	CPSCP (SEQ ID NO:19)	APEFLGGP (SEQ ID NO:20)

«Фрагмент» - Термин «фрагмент», используемый в контексте антител по изобретению, относится к части или области антитела или цепи антитела, содержащей меньше аминокислотных остатков, чем интактное или полное антитело или цепь антитела. Термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к полипептидному фрагменту иммуноглобулина или антитела, который специфически связывает антиген или конкурирует с интактным антителом (т.е. с интактным антителом, из которого он был получен) за антиген-специфическое связывание (например, специфическое связывание с белком C2 или к его частью). Используемый в настоящем описании термин «фрагмент»

молекулы антитела включает антигенсвязывающие фрагменты антител, например, переменный домен легкой цепи антитела (VL), переменный домен тяжелой цепи антитела (VH), одноцепочечное антитело (scFv), фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fab, фрагмент Fd, фрагмент Fv, одноцепочечное (моновалентное) антитело, диантитело, триантитело, тетраантитело или любую антигенсвязывающую молекулу, образованную комбинацией, сборкой или конъюгацией таких антигенсвязывающих фрагментов. Термин «антигенсвязывающий фрагмент», используемый в настоящем описании, также предназначен для охвата фрагментов антител, выбранных из группы, состоящей из «unibodies», доменных антител и наноантител. Фрагменты могут быть получены, например, посредством химической или ферментативной обработки интактного или полного антитела или цепи антитела, или рекомбинантными способами.

Компонент комплемента C2

Второй компонент комплемента человека (C2) представляет собой гликопротеин 90-100 кДа, который участвует в классическом и лектиновом путях активации комплемента. C2 может быть активирован C1 классического пути или активированным MASP2 лектинового пути. C2 связывается с поверхностно связанным C4b (в присутствии Mg²⁺) с образованием комплекса C4bC2, который затем расщепляется активированными C1s или MASP2 на два фрагмента: более крупный фрагмент 70 кДа, традиционно обозначаемый C2a, который остается прикрепленным к C4b с образованием C3-конвертаза C4bC2a и N-концевой фрагмент меньшего размера 30 кДа, традиционно обозначаемый C2b, который высвобождается в жидкую фазу. Некоторые авторы недавно поменяли местами обозначения C2a и C2b, так что C2b относится к большему фрагменту 70 кДа, а C2a относится к меньшему фрагменту 30 кДа. В данном контексте C2a будет относиться к большему фрагменту 70 кДа, а C2b будет относиться к меньшему фрагменту 30 кДа. После активации и связывания с C4b, C2a составляет каталитическую субъединицу конвертаз C3 и C5, которые способны расщеплять C3 и C5, соответственно.

Аминокислотная последовательность человеческого C2 известна (номер доступа GenBank No. NM_000063) и соответствует SEQ ID NO: 21.

Аминокислотная последовательность человеческого C2 (SEQ ID NO: 21):

MGPLMVLFCLLFLYPGLADSAPSCPQNVNISGGTFTLSHGWA PGSLLTYSCPQGL
YPSPASRLCKSSGQWQTPGATRSLKAVCKPVRCPAPVSFENGIIYTPRLGSYPVGGNVSF
ECEDGFILRGSPVRQCRPNGMWDGETAVCDNGAGHCPNPGISLGAVRTGFRFGHGDKV
RYRCSSNLVLTGSSERECQGNGVWSGTEPICRQPYSYDFPEDVAPALGTSFSHMLGATN
PTQKTKESSLGRKIQIRSGHLNLYLLLDSCSVSENDFLIFKESASLMVDRIFSFEINVSV
AHTFASEPKVLMSVLNDNSRDMTEVISSLENANYKDHENGTGTNTYAALNSVYLMMNN
QMRLLGMETMAWQEIRHAILLTDGKSNMGGSPKTAVDHIREILNINQKRNDYLDIYAI
GVGKLDVDWRELNELGSKKDGERHAFILQDTKALHQVFEHMLDVSKLTDTICGVGNM
SANASDQERTPWHVTIKPKSQETCRGALISDQWVLTAAHCFRDGNDHSLWRVNVGDPK
SQWGKEFLIEKAVISPGFDVFAKKNQGILEFYGDDIALKLAKVKMSTHARPICLPCTM
EANLALRRPQGSTCRDHENELLNKQSVPAHFVALNGSKLNINLKMGEVWTS CAEVVSQ

EKTMFPNLTDVREVVTDQFLCSGTQEDESCKGESGGAVFLERRFRFFQVGLVSWGLY
NPCLGSADKNSRKRAPRSKVPPPRDFHINLFRMQPWLRQHLGDVLNFLPL

Как и многие другие белки плазмы, C2 имеет модульную структуру. Начиная со своего N-конца, C2 состоит из трех модулей белка контроля комплемента (CCP1-3, также известный как короткие консенсусные повторы (SCR) или повторы sushi-домена), домена фактора фон Виллебранда типа А (vWFA), содержащего сайт адгезии, зависимый от ионов металла, и домена сериновой протеазы (SP) (Arlaud et al., Adv Immunol 1998, 69: 249). Электронно-микроскопические исследования показали, что C2 состоит из трех доменов. Три модуля CCP (CCP1-3) вместе образуют N-концевой домен, который соответствует C2b. Домен vWFA составляет второй домен, а домен SP составляет третий домен. Второй и третий домены вместе составляют большую часть молекулы C2a.

Модули CCP представляют собой общие структурные мотивы, встречающиеся в ряде белков. Эти глобулярные единицы состоят приблизительно из 60 аминокислотных остатков и свернуты в компактную структуру из шести-восьми-цепочечных β -листов, построенных вокруг четырех инвариантных дисульфидно-связанных остатков цистеина (Norman et al., J Mol Biol 1991, 219: 717). Соседние модули CCP ковалентно прикреплены слабо консервативными линкерами.

Первоначальное связывание C2 с поверхностно связанным C4b опосредуется двумя сайтами с низкой аффинностью, одним на C2b (Xu & Volanakis, J Immunol 1997, 158: 5958), а другим на vWFA-домене C2a (Horiuchi et al., J Immunol 1991, 47: 584). Хотя кристаллическая структура C2b и C2a была определена с разрешением 1,8 Å (Milder et al., Structure 2006, 14: 1587; Krishnan et al., J Mol Biol 2007, 367: 224; Krishnan et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2009, D65: 266), точная топология и структура аминокислотных остатков, составляющих сайт(ы) контакта для C4 и C3 на C2, неизвестны. Таким образом, аминокислотные остатки C2, участвующие во взаимодействии с C4, еще предстоит установить (Krishnan et al., Acta Crystallogr D Biol. Crystallogr 2009, D65: 266).

Антитела против C2

Аспектом изобретения является моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с фактором комплемента C2 человека, где указанное моноклональное антитело или его фрагмент содержит:

домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и

домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;

где аминокислотные остатки 72-74 (нумерация Kabat) домена VH состоят из $X_1X_2X_3$, соответственно, где X_2 представляет собой любую аминокислоту, а $X_1X_2X_3$ не является NX_2S или NX_2T .

Домен VH включает области, определяющие комплементарность, (CDR), HCDR1, HCDR2 и HCDR3. Домен VL состоит из CDR LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 показаны в Таблице 2.

Таблица 2. CDR

HCDR1 DYNMD (SEQ ID NO: 22)

HCDR2 DINPNYESTGYNQKFKG (SEQ ID NO: 23)

HCDR3 EDDHDAFAY (SEQ ID NO: 24)

LCDR1 RASKSVRTSGYNYMH (SEQ ID NO: 25)

LCDR2 LASNLKS (SEQ ID NO: 26)

LCDR3 QHSRELPYT (SEQ ID NO: 27)

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с фактором комплемента C2b человека. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с эпитопом в части фактора комплемента C2 человека, соответствующей человеческому фактору комплемента C2b.

В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи негликозилирован. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи не включает потенциальный сайт гликозилирования, который характеризуется последовательностью NXS/T, где N представляет собой аспарагин, X представляет собой любую аминокислоту, а S/T представляет собой серин или треонин. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антитела с доменом VH, содержащим последовательность N-X-S/T, можно модифицировать так, чтобы эти остатки состояли из $X_1X_2X_3$, соответственно, где X_2 представляет собой любую аминокислоту, а $X_1X_2X_3$ не является NX_2S или NX_2T . То есть, X_1 может быть любой аминокислотой, отличной от N, и/или X_3 может быть любой аминокислотой, отличной от S или T. В некоторых вариантах осуществления антитела с доменом VH, содержащим последовательность NXS или NXT, могут быть модифицированы так, чтобы эти три остатка состояли из DXS , соответственно. В некоторых других вариантах осуществления антитела с доменом VH, содержащим последовательность N-X-S или N-X-T, можно модифицировать так, чтобы эти три остатка состояли из $D-X-T$, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления аминокислоты тяжелой цепи при остатках 72-74 (нумерация по Kabat) состоят из $X_1X_2X_3$, соответственно, где X_2 представляет собой любую аминокислоту, а $X_1X_2X_3$ не является NX_2S или NX_2T .

В некоторых вариантах осуществления аминокислоты тяжелой цепи при остатках 72-74 (нумерация по Kabat) состоят из DX_2S .

В некоторых вариантах осуществления аминокислоты тяжелой цепи при остатках 72-74 (нумерация по Kabat) состоят из DKS .

В некоторых вариантах осуществления домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность домена VH состоит из последовательности SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления домен VL содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность домена VL состоит из последовательности SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность домена VH состоит из последовательности SEQ ID NO: 3, а аминокислотная последовательность домена VL состоит из последовательности SEQ ID NO: 2.

Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 2 представлены в Таблице 3. SEQ ID NO: 2 соответствует домену VL (VK3) гуманизированного 5F2.4 (BRO2), раскрытого в Патенте США № 9944717, Broteio Pharma B.V. Также в Таблице 3 показано, что SEQ ID NO: 28 соответствует домену VH (VH4) гуманизированного 5F2.4 (BRO2), раскрытого в Патенте США № 9944717, который включен в настоящее описание в качестве ссылки.

Таблица 3 Домены VH и VL

ID	Последовательность	SEQ ID NO:
5F2.4 VH4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQATG QGLEWIGDINPNYESTGYNQKFKGRATMTVNKISISTAYMELSSL RSED TAVYYCAREDDHDAFAYWGQGTLVTVSS	28
VH4.2 generic	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQATG QGLEWIGDINPNYESTGYNQKFKGRATMTVX ₁ X ₂ X ₃ ISTAYMELSS LRSED TAVYYCAREDDHDAFAYWGQGTLVTVSS	1
VH4.2 ARGX- 117	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQATG QGLEWIGDINPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSISTAYMELSSL RSED TAVYYCAREDDHDAFAYWGQGTLVTVSS	3
5F2.4 VK3	DNVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASKSVRTSGYNYMHWYQQKP GQPPKLLIYLASNLSKGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDAATY YCQHSRELPTYFGQGTKLEIK	2

В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела по изобретению включают домен CH1, шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3 человеческого антитела, в частности, человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает домен CH1, шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3 человеческого IgG1 и включает замены L234A и L235A в домене CH2.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает домен CH1, шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3 человеческого IgG1 и включает замены H433K и N434F в домене CH3.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает домен CH1, шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3 человеческого IgG1 и включает замены L234A и L235A в домене CH2 и замены H433K и N434F в домене CH3.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает домен CH1, шарнирный

домен, домен CH2 и домен CH3 человеческого IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело включает домен CH1, шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3 человеческого IgG4 и включает замену S228P в шарнирном домене.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает домен CH1, шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3 человеческого IgG4 и включает замену L445P в домене CH3.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает домен CH1, шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3 человеческого IgG4 и включает как замену S228P в шарнирном домене, так и замену L445P в домене CH3.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает домен CH1, шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3 человеческого IgG4 и включает замены H433K и N434F в домене CH3.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает домен CH1, шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3 человеческого IgG4 и включает замену S228P в шарнирном домене и замены H433K и N434F в домене CH3.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает домен CH1, шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3 человеческого IgG4 и включает замены H433K, N434F и L445P в домене CH3.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает домен CH1, шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3 человеческого IgG4 и включает замену S228P в шарнирном домене и замены H433K, N434F и L445P в домене CH3.

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело содержит константный домен тяжелой цепи человеческого IgG. В некоторых вариантах осуществления константный домен тяжелой цепи содержит константный домен тяжелой цепи человеческого IgG1. В некоторых вариантах осуществления константный домен тяжелой цепи состоит из константного домена тяжелой цепи человеческого IgG1.

В некоторых вариантах осуществления константный домен тяжелой цепи содержит константный домен тяжелой цепи человеческого IgG1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность константного домена тяжелой цепи состоит из последовательности SEQ ID NO: 29.

В некоторых вариантах осуществления константный домен тяжелой цепи содержит константный домен тяжелой цепи человеческого IgG1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность константного домена тяжелой цепи состоит из последовательности SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления константный домен тяжелой цепи содержит константный домен тяжелой цепи человеческого IgG4. В некоторых вариантах осуществления константный домен тяжелой цепи состоит из константного домена тяжелой цепи человеческого IgG1.

В некоторых вариантах осуществления константный домен тяжелой цепи содержит константный домен тяжелой цепи человеческого IgG4, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность константного домена тяжелой цепи состоит из последовательности SEQ ID NO: 30.

В некоторых вариантах осуществления константный домен тяжелой цепи содержит константный домен тяжелой цепи человеческого IgG4, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность константного домена тяжелой цепи состоит из последовательности SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления константный домен тяжелой цепи содержит константный домен тяжелой цепи человеческого IgG4, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность константного домена тяжелой цепи состоит из последовательности SEQ ID NO: 5.

Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 29-31 представлены в Таблице 4.

Таблица 4 - Константные домены тяжелой цепи

ID	Последовательность	SEQ ID NO:
Человеческий IgG1 (UniProt)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	29
Человеческий IgG1 LALA NHance (ARGX-117)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALKFHYTQKSLSLSPG	4
Человеческий IgG4 (UniProt)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTQSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL LGK	30

Человеческий IgG4 S228P L445P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	31
Человеческий IgG4 S228P NHance L445P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL K FHYTQK SLSLSPGK	5

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит полноразмерное моноклональное антитело.

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент состоит из полноразмерного моноклонального антитела.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложены моноклональные антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложены моноклональные антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложены моноклональные антитела, содержащие легкую цепь, имеющую по меньшей мере, 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложены моноклональные антитела, содержащие легкую цепь, имеющую 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложены моноклональные антитела, содержащие

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложены моноклональные антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложены моноклональные антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложены моноклональные антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по

меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, и легкую цепь, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложены моноклональные антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, и легкую цепь, имеющую 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7.

Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6-8 и 32-34 представлены в Таблице 5.

Таблица 5. Тяжелые цепи и легкие цепи

ID	Последовательность	SEQ ID NO:
Человеческий IgG1 (UniProt)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQA TGQGLEWIGDINPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSISTAYM ELSSLRSEDТАVYYCAREDDHDAFAYWGQGTЛTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGТАALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	32
Человеческий IgG1 LALA NHance (ARGX-117)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQA TGQGLEWIGDINPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSISTAYM ELSSLRSEDТАVYYCAREDDHDAFAYWGQGTЛTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGТАALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALKFHYTQKSLSLSPG	6
Человеческий IgG4 (UniProt)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQA TGQGLEWIGDINPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSISTAYM ELSSLRSEDТАVYYCAREDDHDAFAYWGQGTЛTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	33

Человеческий IgG4 S228P L445P	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMD WVRQATGQGLEWIGDINPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSI STAYMELSSLRSED TAVYYCAREDDHDAFAYWGQGT LTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP PKP KDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	34
Человеческий IgG4 S228P NHance L445P	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMD WVRQATGQGLEWIGDINPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSI STAYMELSSLRSED TAVYYCAREDDHDAFAYWGQGT LTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP PKP KDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALKFHYTQKSLSLSPGK	8
Light Chain (ARGX-117)	DNVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASKSVRTSGYNYM HWYQQKPGQPPKLLIYLASNLSGVDPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDAATYYCQHSRELPTYFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC	7

Для вариантов осуществления, где тяжелая и/или легкая цепи антител определяются по конкретному проценту идентичности последовательности с эталонной последовательностью, тяжелая цепь и/или легкая цепь могут сохранять последовательности CDR, идентичные последовательностям, присутствующим в эталонной последовательности, так что вариация присутствует только вне областей CDR.

Если в настоящей заявке не указано иное, то % идентичности последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен путем сравнения этих двух последовательностей, выровненных оптимальным образом, и при этом

аминокислотная последовательность, которую нужно сравнивать, может содержать вставки или делеции по отношению к эталонной последовательности для оптимального выравнивания между этими двумя последовательностями. Процент идентичности рассчитывается путем определения количества идентичных положений, для которых аминокислотный остаток идентичен между двумя последовательностями, путем деления этого количества идентичных положений на общее количество положений в окне сравнения и умножения полученного результата на 100, чтобы получить процент идентичности между этими двумя последовательностями. Например, можно использовать программу BLAST, «Последовательности BLAST 2» (Tatusova et al, «Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences», FEMS Microbiol Lett. 174: 247-250), при этом используемые параметры соответствуют параметрам, заданным по умолчанию (в частности, для параметров «штраф за открытый пробел»: 5 и «штраф за удлинение пробела»: 2; выбранная матрица представляет собой, например, матрицу «BLOSUM 62», предложенную программой), процент идентичности между двумя сравниваемыми последовательностями рассчитывается непосредственно программой.

В неограничивающих вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут содержать домены CH1 и/или домены CL (из тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно), аминокислотная последовательность которых полностью или по существу человеческая. Когда антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению представляет собой антитело, предназначенное для терапевтического использования человеком, типично для всей константной области антитела или, по меньшей мере, его части, содержать полностью или по существу человеческую аминокислотную последовательность. Следовательно, одна или более или любая комбинация домена CL, домена CH1, шарнирной области, домена CH2, домена CH3 и домена CH4 (если присутствует) может быть полностью или по существу человеческой в отношении ее аминокислотной последовательности.

Преимущественно домен CL, домен CH1, шарнирная область, домен CH2, домен CH3 и домен CH4 (если присутствует) могут все иметь полностью или по существу человеческую аминокислотную последовательность. В контексте константной области гуманизированного или химерного антитела или фрагмента антитела термин «по существу человеческий» относится к идентичности аминокислотной последовательности, составляющей по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 99% с человеческой константной областью. Термин «человеческая аминокислотная последовательность» в данном контексте относится к аминокислотной последовательности, которая кодируется геном иммуноглобулина человека, который включает гены зародышевой линии, реаранжированные и соматически мутированные гены. В изобретении также рассматриваются полипептиды, содержащие константные домены «человеческой» последовательности, которые были изменены путем вставки, делеции или замены одной или более аминокислот по отношению к человеческой последовательности, за

исключением тех вариантов осуществления, в которых присутствие «полностью человеческой» шарнирной области явно требуется.

Присутствие «полностью человеческой» шарнирной области в C2-связывающих антителах по изобретению может быть полезным как для минимизации иммуногенности, так и для оптимизации стабильности антитела.

C2-связывающие антитела могут быть модифицированы в области Fc для увеличения аффинности связывания неонатального рецептора Fc, FcRn. Повышенную аффинность связывания можно измерить при кислом pH (например, от приблизительно pH 5,5 до приблизительно pH 6). Повышенную аффинность связывания также можно измерить при нейтральном pH (например, от приблизительно pH 6,9 до приблизительно pH 7,4). В этом варианте осуществления под «повышенной аффинностью связывания» подразумевается повышенная аффинность связывания с FcRn по сравнению с аффинностью связывания немодифицированной области Fc. Обычно немодифицированная область Fc обладает аминокислотной последовательностью человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа. В таких вариантах осуществления повышенная аффинность связывания с FcRn молекулы антитела, имеющей модифицированную область Fc, будет измеряться относительно аффинности связывания IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа для FcRn.

C2-связывающие антитела могут быть модифицированы в области Fc для увеличения аффинности связывания с человеческим неонатальным Fc-рецептором FcRn. Повышенную аффинность связывания можно измерить при кислом pH (например, от приблизительно pH 5,5 до приблизительно pH 6). Повышенную аффинность связывания также можно измерить при нейтральном pH (например, от приблизительно pH 6,9 до приблизительно pH 7,4). В этом варианте осуществления под «повышенной аффинностью связывания» подразумевается повышенная аффинность связывания с человеческим FcRn по сравнению с аффинностью связывания немодифицированной области Fc. Обычно немодифицированная область Fc обладает аминокислотной последовательностью человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа. В таких вариантах осуществления повышенная аффинность связывания с человеческим FcRn молекулы антитела, имеющей модифицированную область Fc, будет измеряться относительно аффинности связывания IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа с человеческим FcRn.

Фармацевтические композиции

Аспектом изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с фактором комплемента C2 человека, и фармацевтически приемлемый носитель, где указанное моноклональное антитело или его фрагмент содержит:

домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и

домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;

где аминокислотные остатки 72-74 (нумерация Kabat) домена VH состоят из $X_1X_2X_3$, соответственно, где X_2 представляет собой любую аминокислоту, а $X_1X_2X_3$ не является NX_2S или NX_2T .

Фармацевтическая композиция по изобретению может быть приготовлена вместе с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, а также с любыми другими известными адьювантами и вспомогательными веществами в соответствии с обычными методами, такими как те, что описаны в (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19 Edition, Gennaro, Ed. ., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1995).

Термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к носителям или вспомогательным веществам, которые по своей природе нетоксичны. Примерами таких вспомогательных веществ являются, но не ограничиваются ими, физиологический раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и раствор Хенкса. Также можно использовать неводные вспомогательные вещества, такие как жирные масла и этилолеат.

Фармацевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть приготовлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Примеры подходящих носителей на водной и не водной основе, которые можно использовать в фармацевтических композициях по изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло и сложные органические эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Соответствующая текучесть может поддерживаться, например, с помощью применения покрывающих материалов, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий, и с помощью использования ПАВ.

Фармацевтические композиции могут также содержать адьюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Предотвращение присутствия микроорганизмов может быть обеспечено процедурами стерилизации, и путем включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлоробутанола, фенолсорбиновой кислоты и т. п. Также может быть желательно включить в композиции изотонические агенты, такие как сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, глицерин или хлорид натрия. Также могут быть включены фармацевтически приемлемые антиоксиданты, например (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и тому подобное; (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и тому подобное; и (3) хелатирующие агенты с металлами, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т. п.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения моноклонального антитела в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, например, как указано выше, если требуется, с последующей стерилизацией микрофильтрацией. Обычно дисперсии готовят путем

включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты, например, из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов, предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые дают на выходе порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный требуемый ингредиент из его предварительно стерильно фильтрованного раствора.

Фармацевтическую композицию предпочтительно вводят парентерально, предпочтительно путем внутривенной (i.v.) или подкожной (s.c.) инъекции или инфузии.

Фразы «парентеральное введение» и «вводимый парентерально» в контексте настоящего описания означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, внутритрахеальную, внутрикапсулярную, внутриорбитальную, внутрикардиальную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, внутриспинальную, эпидуральную и надчревную инъекцию или инфузию.

Пролонгированная абсорбция инъекционных mAb против C2 или их фрагментов может быть достигнута путем включения в композицию агента, замедляющего абсорбцию, например, солей моностеарата и желатина.

mAb или их фрагменты могут быть получены с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, такими как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микрокапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы приготовления таких составов, как правило, хорошо известны специалистам в данной области. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Фармацевтические композиции можно вводить с помощью медицинских устройств, известных в данной области.

Схемы дозировки корректируются для обеспечения оптимального требуемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, может быть введен одиночный болюс, могут быть введены несколько доз в течение периода времени или дозы могут быть пропорционально уменьшены или увеличены в зависимости от потребностей терапевтической ситуации.

Фактические уровни дозировки mAb или их фрагментов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьироваться с получением количества активного ингредиента, которое эффективно для достижения требуемого терапевтического ответа для конкретного пациента, не будучи токсичным для пациента.

В одном варианте осуществления связывающие молекулы, в частности, антитела по

изобретению можно вводить путем инфузии с недельной дозировкой от 10 до 500 мг/м², например от 200 до 400 мг/м². Такое введение можно повторять, например, 1-8 раз, например 3-5 раз. Введение может осуществляться путем непрерывной инфузии в течение периода от 1 до 24 часов, например, периода от 2 до 12 часов. В некоторых вариантах осуществления введение может осуществляться посредством одной или более болюсных инъекций.

В одном варианте осуществления связывающие молекулы, в частности, антитела по изобретению можно вводить путем инфузии в еженедельной дозе от 1 до 50 мг на кг массы тела (мг/кг), например от 5 до 25 мг/кг. Такое введение можно повторять, например, 1-8 раз, например 3-5 раз. Введение может осуществляться путем непрерывной инфузии в течение периода от 1 до 24 часов, например, периода от 2 до 12 часов. В некоторых вариантах осуществления введение может осуществляться посредством одной или более болюсных инъекций.

Еще в одном варианте осуществления mAb или их фрагменты или любые другие связывающие молекулы, раскрытые в настоящем изобретении, можно вводить в качестве поддерживающей терапии, например, один раз в неделю в течение 6 месяцев или более.

Молекулы нуклеиновых кислот и векторы

Аспектом изобретения является молекула нуклеиновой кислоты или множество молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. В некоторых вариантах осуществления одна молекула нуклеиновой кислоты кодирует как VH, так и VL домены моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. В некоторых вариантах осуществления одна молекула нуклеиновой кислоты кодирует как тяжелую цепь (HC), так и легкую цепь (LC) моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. В некоторых вариантах осуществления первая молекула нуклеиновой кислоты кодирует домен VH, а вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует домен VL моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. В некоторых вариантах осуществления первая молекула нуклеиновой кислоты кодирует тяжелую цепь (HC), а вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует легкую цепь (LC) моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая домен VH, содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 35.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая домен VL, содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая HC, содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая LC, содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая HC, содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая HC, содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая HC, содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая домен LC, содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей домен VH, состоит из последовательности SEQ ID NO: 35.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей домен VL, состоит из последовательности SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей HC, состоит из последовательности SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей HC, состоит из последовательности SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей HC, состоит из последовательности SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей HC, состоит из последовательности SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей HC, состоит из последовательности SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей домен LC, состоит из последовательности SEQ ID NO: 42.

Последовательности нуклеиновых кислот, соответствующие SEQ ID NO: 35-42, представлены в Таблице 6.

Таблица 6. Последовательности нуклеиновых кислот VH, VL, HC и LC

ID	Последовательность	SEQ ID NO:
BRO2-IgG4	gaagtgcagctggtgcagctctggcgccgaagtgaagaaacctggcgccctccgtgaaggtgtcctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacaacatggactgggtgacaggtaccggccaggcctg	35

VH4.2	gaatggatcggcgacatcaacccaactacgagtcaccggctacaaccagaagtcaagggcagagccaccatgaccgtggacaagtcacatccaccgcctacatggaactgtcctcctcgaggagcaggacaccgcccgtactactgcgccagagaggacgaccacgacgcctttgcttattggggccagggcaccctcgtgaccgtgtcctct	
BRO2 VL	gacaacgtgctgaccagtcacctgactccttggtgtgtctctgggcgagagagccaccatctcttgc cgggctctaaagtcctgctggaccccggtacaaactacatgcactggatcagcagaagccccggcca gcccccaagctgctgatctacctggcctcaacctgaagtcggcgtgcccagacagattctccggctc tggctctggcaccgactttacctgaccatcagctccctgcaggccgaggatgccgccactactactg ccagcactccagagagctgcctacacctttggccagggcaccaagctggaaatcaag	36
BRO2- hIgG1 HC	gaagttcagctgggtcagctctggcgccgaagtgaagaaacctggcgccctctgtgaaggtgtctgcaag gcttctggctacacctttaccgactacaacatggactgggtccgacaggctaccggacagggacttgag tggatcggcgacatcaacccaactacgagtcaccggctacaaccagaagttcaagggcagagcca ccatgaccgtggacaagtccatctccaccgcctacatggaactgtccagcctgagatctgaggacacc gccgtgtactactgcgccagagaggatgatcacgacgcctttgcttattggggccagggcacactggtc accgtgtcctctgccagtacaaaagggtcaagtgtgtccctctgtcctcctatccaaggtaccagtgga aggcaccgccgtcttggtgcttggttaaggattatttccagagcctgtcactgtttcatggaactccg ggccttgacatctgggtgtcataccttccagccgtgtgcagtcagtgccctctacagcctcagtag cgtggctactgtgccagcagctctctcggcacacaaactatctgtaagtgaatcataagccttcaa ataccaaggtggataagaaagtggaaacaaaatcatgtgacaagacacacacctgcccctctgtccag ccccgaaactgtgggtgggcccagcgtgttctgttctcctaaacccaaagacactctgatgattagt aggaccccgagaagtcacttgcgtgggttgacgtgtcacatgaagatcccaggtcaagttcaattggt atgttgacgggtgcaagttcacaacgctaaaactaaaccaagagaggaacagtataactctacctacc ggggtgggtgagtggtctgactgtcctccatcaagactgggtgaatggcaagaatacaagtgaaggtga gcaacaaagccctgcccgtcctatagagaaaacaatatccaaagccaaaggtcaacctcgcgagcc acaggtgtacacctcccaccaagccgcgatgaactactaagaaccaagctctcttacttgcttggtta aggggttctatccatccgacattgcagtcgagtgaggagctaatggacagcctgagaacaaactacaaaa ccacctctctgttctggattctgacggatcttcttcttattctaaactaccgtggataaaagcaggtg gcagcagggcaacgtgttcagctgttccgttatgcatgaggccctgcataaccattataccagaagctt tgtccctcagtcaggaaag	37
BRO2- hIgG1- LALA-NH HC	gaagttcagctgggtcagctctggcgccgaagtgaagaaacctggcgccctctgtgaaggtgtctgcaag gcttctggctacacctttaccgactacaacatggactgggtccgacaggctaccggacagggacttgag tggatcggcgacatcaacccaactacgagtcaccggctacaaccagaagttcaagggcagagcca ccatgaccgtggacaagtccatctccaccgcctacatggaactgtccagcctgagatctgaggacacc gccgtgtactactgcgccagagaggatgatcacgacgcctttgcttattggggccagggcacactggtc accgtgtcctctgcttctaccaagggaccagcgtgttccctctggctcctccagcaagctacctctgg cggaacagctgctctgggctgcctggtaaggactacttctgagcctgtgaccgtgtcttggaaactct ggcgctctgacatctggcgtgcacaccttccagctgtgtgcagtcctccggcctgtactctctgtcctct gtctgaccgtgacctccagctctctgggaaccagacctacatctgcaatgtgaaccacaagccttcca acaccaaggtggacaagaaggtggaacccaagtcctgcgacaagaccacacctgtcctccatgtcct gctccagaagctgctggcgcccttccgtgttctgttccctccaaagcctaaggacacctgatgatctc tcggaccctgaagtgacctgcgtgggtggatgtgtctcacgaggaccagaagtgaagttcaattg gtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcctagagaggaacagtacaactccac ctacagagtggtgtccgtgctgaccgtgtgcaccaggattggctgaacggcaagagtacaagtgcga aggtgtccaacaaggccctgcctgtcctatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagcctagg gaacccaggtttacaccttgctcctatctgggacgagctgaccaagaaccaggtgtccctgacctgt ctcgtgaagggcttctacccctccgatatcgccgtggaatgggagctaatggccagccagagaacaa ctacaagacaacccctctgtgtgactccgacggctcattcttctgtactccaagctgacagtggata agtcccggtggcagcagggcaacgtgttctctgtgtgatgcagaggccctgaagttccactaca cacagaagtctctgtctctgagccccggc	38
BRO2- hIgG4 HC	gaagtgacagctgggtcagctctggcgccgaagtgaagaaacctggcgccctcgtgaaggtgtcctgca aggcttccggctacacctttaccgactacaacatggactgggtgcgacaggctaccggccagggcctg gaatggatcggcgacatcaacccaactacgagtcaccggctacaaccagaagttcaagggcagag	39

	ccaccatgaccgtggacaagtccatctccaccgcctacatggaactgtcctccctgcggagcgaggac accgccgtgtactactgcgccagagaggacgaccacgacgcctttgcttattggggccagggcaccct cgtgaccgtgtcctctgtcttaccgaaggccccctcgtgttccctctgccccctgtccagatccacct ccgagtctaccgccgtctgggctgcctcgtgaaggactactccccgagccccgtgacagtgtcttggga actctggcgccctgacctccggcgtgcacacctttccagctgtgtcagtcctccggcctgtactccct gtcctccgtcgtgactgtgccccccagctctctggggaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaa gccccccaacaccaagggtggacaagcgggtggaatctaagtacggccctccctgccctccttggccag ccctgaatttctggggcgaccagcgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgatgatctc ccggacccccgaagtgacctgcgtgggtggatgtgtcccaggaagatcccaggtgcagttcaatt gggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcctagagaggaacagttcaactcca cctaccgggtggtgtcctgtgctgacctgtgtgcaccaggattggctgaacggcaagagtacaagtgc aaggtgtccaacaaggccctgccttcagcatcgaaaagacctctccaaggccaaggccagcccc gggaacccccaggtgtacacactgcctccaagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgac ctgtctcgtgaaaggcttaccctccgatatcgccgtggaatgggagtcacaacggccagcctgagaa caactacaagaccacccccctgtgtgactccgacggctccttcttctgtactctgcctgaccgtg gataagtcccggtggcaggaaggcaacgtgttctcctgtcctgtatgcacgaggccctgcacaacca ctataccagaagtccctgtcctgtctctgggaaag	
BRO2- hIgG4- S228P- L445P HC	gaagtgcagctggtgcagctctggcgccgaagtgaanaaacctggcgccctcctgtaaggtgtcctgcaa ggctagcgggtacacctttaccgactacaacatggactgggtccgacaggccacaggacaggactc gagtggatcggcgacatcaacccccactacgagagcaccggctacaaccagaagttaaggggcaga gccaccatgaccgtggacaagagcatcagcaccgcctacatggaactgagcagcctgagaagcgag gacaccgccgtgtactactgcgccagagaggatgatcacgacgcctttgcctattggggccaggggcac actggtcaccgttagctctgctagaccaaggggcccatcggtcttccccctggcgccctgtcaccaggag cacctccgagagcacagccgcctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgt cgtggaaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccggctgtctacagtcctcaggactct actccctcagcagcgtggtgacctgtccctccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgta gatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagattgagtccaaatattggtccccatgccac catgccagcacctgagttcctggggggaccatcagttctcctgttcccccaaaacccaaggacactc tcatgatctcccgaccctgaggtcacgtgcgtgggtggacgtgagccaggaagacccccgaggt ccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgcgggaggagcag ttcaacagcacgtaccgtgtgtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaagga gtacaagtgaagggtctccaacaaggcctccctcctccatcgagaaaacctctccaagccaaag ggcagccccgagagccacaggtgtacacctgcccccatcccaggaggagatgaccaagaaccag gtcagcctgacctgcctgggtcaaaaggcttacccccagcagatcgccgtggagtgggagagcaatgg gcagccggagaaactacaagaccacgcctcccgctgtgactccgacggctccttcttctctacag cagggtcaccgtggacaagagcaggtggcaggagggaatgtcttctcatgtcctgtatgcagagg ctctgcacaaccactacacagagaagagccttccctgtctccgggtaaatgagtcctagctgg	40
BRO2- hIgG4- S228P- NH-L445P HC	gaagtgcagctggtgcagctctggcgccgaagtgaanaaacctggcgccctcctgtaaggtgtcctgcaa ggctagcgggtacacctttaccgactacaacatggactgggtccgacaggccacaggacaggactc gagtggatcggcgacatcaacccccactacgagagcaccggctacaaccagaagttaaggggcaga gccaccatgaccgtggacaagagcatcagcaccgcctacatggaactgagcagcctgagaagcgag gacaccgccgtgtactactgcgccagagaggatgatcacgacgcctttgcctattggggccaggggcac actggtcaccgttagctctgctagaccaaggggcccatcggtcttccccctggcgccctgtcaccaggag cacctccgagagcacagccgcctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgt cgtggaaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccggctgtctacagtcctcaggactct actccctcagcagcgtggtgacctgtccctccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgta gatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagattgagtccaaatattggtccccatgccac catgccagcacctgagttcctggggggaccatcagttctcctgttcccccaaaacccaaggacactc tcatgatctcccgaccctgaggtcacgtgcgtgggtggacgtgagccaggaagacccccgaggt ccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgcgggaggagcag ttcaacagcacgtaccgtgtgtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaagga gtacaagtgaagggtctccaacaaggcctccctcctccatcgagaaaacctctccaagccaaag ggcagccccgagagccacaggtgtacacctgcccccatcccaggaggagatgaccaagaaccag gtcagcctgacctgcctgggtcaaaaggcttacccccagcagatcgccgtggagtgggagagcaatgg gcagccggagaaactacaagaccacgcctcccgctgtgactccgacggctccttcttctctacag cagggtcaccgtggacaagagcaggtggcaggagggaatgtcttctcatgtcctgtatgcagagg ctctgcacaaccactacacagagaagagccttccctgtctccgggtaaatgagtcctagctgg	41

	ggcagccccgagagccacaggtgtacaccctgccccatcccaggaggagatgaccaagaaccag gtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgg gcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctctctacag caggctcaccgtggacaagagcaggtggcaggagggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgagg ctctgaagtccactacacagaagagcctctccctgtctccgggtaaa	
BRO2 LC	gacaacgtgctgacccagtccccctgactccctggctgtgtctctggcgagagagccaccatctcttgc cgggctcctaagtccgtgcggacctccggctacaactacatgcactggatcagcagaagcccggcca gcccccaagctgctgatctacctggcctccaacctgaagtccggcgtgcccagacagattctccggctc tggtcttggcaccgactttaccctgaccatcagctccctgcaggccgaggatgccgccactactactg ccagcactccagagagctgccttacaccttggccaggggcaccaagctggaaatcaagcggaccgtg gccgctccctccgtgttcatcttcccaccttccgacgagcagctgaagtctggcacagcctccgtcgtgt gcctgtgaacaacttctacccccgcgaggccaaggtgcagtggaaaggtggacaacgccctgcagtc cggcaactcccaggaatccgtgaccgagcaggactccaaggacagcacctactccctgtctccacc tgaccctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaagtgacccaccagggcct gtctagccccgtgaccaagtcttcaaccggggcgagtgc	42

Для SEQ ID NO: 35 и 39 a217g создает мутацию N72D.

Изобретение также относится к носителю для доставки генов или вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению. Носитель для доставки гена или вектор может представлять собой плазмиду или другую нуклеиновую кислоту, реплицируемую в бактериях. Такой носитель для доставки генов или вектор можно легко перенести, например, в клетки-продуценты. Носитель для доставки гена также может быть вирусным вектором. Предпочтительными вирусными векторами являются аденовирусные векторы, лентивирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы и ретровирусные векторы.

Изобретение также относится к векторам, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты или множество молекул нуклеиновой кислоты по изобретению. В некоторых вариантах осуществления один вектор содержит одну молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую как VH, так и VL домены моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. В некоторых вариантах осуществления один вектор содержит одну молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую как тяжелую цепь (HC), так и легкую цепь (LC) моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления первый вектор содержит первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую домен VH, а второй вектор содержит вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую домен VL моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. В некоторых вариантах осуществления первый вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь (HC), а второй вектор содержит вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь (LC) моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению.

Векторы по изобретению включают экспрессирующие векторы, подходящие для использования при экспрессии моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента клеткой-хозяином. Клетки-хозяева могут быть эукариотическими или

прокариотическими.

Изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты или множество молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению. Альтернативно или в дополнение, изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей вектор или множество векторов, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению. Молекула или молекулы нуклеиновой кислоты, или аналогично вектор или векторы, могут быть введены в клетку-хозяина с использованием любого подходящего метода, включая, например, и без ограничения, трансдукцию, трансформацию, трансфекцию и инъекцию. Различные формы этих методов хорошо известны в данной области, включая, например, электропорацию, трансфекцию фосфатом кальция, липофекцию, сжатие клеток, сонопорацию, оптическую трансфекцию и генную пушку.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой дрожжевую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку насекомого. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, выбранную из группы, состоящей из клеток гибридомы, клеток яичника китайского хомячка (CHO), клеток NS0, эмбриональных клеток почки человека (HEK293) и клеток PER.C6TM. В изобретении также рассматриваются другие клетки-хозяева в дополнение к упомянутым выше. Клетки-хозяева также включают клеточные линии, разработанные для коммерческого производства антител и их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению.

Клеточные линии, снабженные нуклеиновой кислотой, могут продуцировать связывающую молекулу/антитело в лаборатории или на производственном предприятии. Альтернативно, нуклеиновая кислота переносится в клетку в организме животного, нуждающегося в этом, и связывающая молекула/антитело продуцируется *in vivo* трансформированной клеткой. Молекула нуклеиновой кислоты по изобретению обычно снабжена регуляторными последовательностями для экспрессии связывающей молекулы в клетке. Однако современные методы гомологичной рекомбинации стали намного более эффективными. Эти методы включают, например, гомологичную рекомбинацию с помощью двухцепочечного разрыва с использованием сайт-специфичных нуклеаз, индуцирующих двухцепочечный разрыв, таких как TALEN. Такие или аналогичные системы гомологичной рекомбинации могут вставлять молекулу нуклеиновой кислоты в область, которая обеспечивает одну или более требуемых *in cis* регуляторных последовательностей.

Изобретение также относится к выделенной или рекомбинантной клетке или клеточной культуре *in vitro*, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты или вектор по

изобретению. Изобретение также относится к выделенной или рекомбинантной клетке или клеточной культуре *in vitro*, содержащей связывающую молекулу по изобретению. Предпочтительно указанная клетка продуцирует указанную связывающую молекулу. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка секретирует указанную связывающую молекулу. В предпочтительном варианте осуществления указанная клетка представляет собой клетку гибридомы, клетку CHO, клетку NS0, клетку HEK293 или клетку PER-C6TM. В особенно предпочтительном варианте осуществления указанная клетка представляет собой клетку CHO. Кроме того, обеспечивается культура клеток, содержащая клетку по изобретению. Различные учреждения и компании разработали клеточные линии для крупномасштабного производства антител, например, для клинического использования. Неограничивающими примерами таких клеточных линий являются клетки CHO, клетки NS0 или клетки PER.C6TM. Эти клетки также используются для других целей, таких как продуцирование белков. Клеточные линии, разработанные для продуцирования белков и антител в промышленном масштабе, далее именуются промышленными клеточными линиями. Изобретение относится к промышленной клеточной линии, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, связывающую молекулу и/или антитело по изобретению. Изобретение также относится к клеточной линии, разработанной для крупномасштабного продуцирования белка и/или антитела, содержащего связывающую молекулу или антитело по изобретению. Изобретение также относится к применению клеточной линии, разработанной для крупномасштабного продуцирования связывающей молекулы и/или антитела по изобретению.

Способы получения антител

Изобретение дополнительно относится к способу получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающему культивирование популяции клеток-хозяев по изобретению в условиях, допускающих экспрессию моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает сбор указанного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из культуры. Предпочтительно указанная клетка культивируется в бессывороточной среде. Предпочтительно указанная клетка адаптирована для роста в суспензии. Кроме того, предложено антитело, которое можно получить способом получения антитела по изобретению. Антитело предпочтительно очищают от культуральной среды. Предпочтительно указанное антитело очищено аффинно.

Способы Применения

Аспектом изобретения является способ ингибирования активации классического или лектинового пути у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. В некоторых вариантах осуществления объектом является млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления объектом является мышь, крыса, хомяк, морская свинка, кролик, коза, овца, свинья, кошка, собака, лошадь или корова. В некоторых

вариантах осуществления объектом является примат, не являющийся человеком, например обезьяна. В некоторых вариантах осуществления объектом является человек.

Ингибирующий эффект антитела или антигенсвязывающего фрагмента можно оценить с помощью любого подходящего метода, включая, например, измерение общей активности комплемента, тест гемолитической активности, основанный на способности образца сыворотки лизировать эритроциты овцы, покрытые антителами против овечьего белка. Снижение гемолиза по сравнению с необработанным контрольным образцом указывает на ингибирующий эффект антитела или антигенсвязывающего фрагмента. В одном из вариантов осуществления необработанный контрольный образец может быть исходным образцом, полученным до начала обработки антителом или антигенсвязывающим фрагментом. Как правило, снижение общей активности комплемента по меньшей мере на 5% по сравнению с контролем свидетельствует об эффективности. В некоторых вариантах осуществления снижение общей активности комплемента по меньшей мере на 10% по сравнению с контролем указывает на эффективность.

Заболевания, которые можно лечить или предотвращать с помощью способа или моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, представляют собой аутоиммунные заболевания, такие как экспериментальный аллергический неврит, коллаген-индуцированный артрит II типа, миастения, гемолитическая анемия, гломерулонефрит, идиопатическая мембранозная нефропатия, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, васкулит, вызванный иммунным комплексом, респираторный дистресс-синдром у взрослых, инсульт, ксенотрансплантация, аллотрансплантация, рассеянный склероз, ожоговые травмы, экстракорпоральный диализ и оксигенация крови, воспалительные заболевания, включая сепсис и септический шок, токсичность, индуцированная введением *in vivo* цитокинов или mAb, опосредованное антителами отторжение аллотрансплантатов, таких как почечные аллотрансплантаты, множественные травмы, ишемические реперфузионные повреждения и инфаркт миокарда.

Пациенты, страдающие заболеванием, включающим опосредованное комплементом повреждение, или подверженные риску развития такого опосредованного комплементом повреждения, могут быть подвергнуты лечению путем введения пациенту эффективного количества моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. Таким образом, у пациента снижается уровень биологически активных пептидов, производных комплемента, а литические и другие повреждающие эффекты комплемента на клетки и ткани ослабляются или предотвращаются. Под «эффективным количеством» подразумевается количество, достаточное для достижения желаемого биологического ответа. В одном из вариантов осуществления под «эффективным количеством» подразумевается количество моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, которое способно ингибировать активацию комплемента у индивидуума.

Лечение (профилактическое или терапевтическое) обычно будет состоять из введения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по

изобретению парентерально вместе с фармацевтическим носителем, например, внутривенно, подкожно или местно. Введение обычно может осуществляться путем инъекции или инфузии. Доза и схема введения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению будут зависеть от степени ингибирования направленной на это активации комплемента. Обычно для моноклональных антител по изобретению количество находится в диапазоне от 2 до 20 мг на кг массы тела. Для парентерального введения моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению будет прготовлен в форме для инъекций в комбинации с фармацевтически приемлемым парентеральным носителем. Такие носители хорошо известны в данной области, и их примеры включают физиологический раствор, раствор декстрозы, раствор Рингера и растворы, содержащие небольшие количества человеческого сывороточного альбумина.

Фармацевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть приготовлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Примеры подходящих носителей на водной и не водной основе, которые можно использовать в фармацевтических композициях по изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло и сложные органические эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Соответствующая текучесть может поддерживаться, например, с помощью применения покрывающих материалов, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий, и с помощью использования ПАВ.

Фармацевтические композиции могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Предотвращение присутствия микроорганизмов может быть обеспечено процедурами стерилизации, и путем включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлоробутанола, фенолсорбиновой кислоты и т. п. Также может быть желательно включить в композиции изотонические агенты, такие как сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, глицерин или хлорид натрия. Также могут быть включены фармацевтически приемлемые антиоксиданты, например (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и тому подобное; (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и тому подобное; и (3) хелатирующие агенты с металлами, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т. п.

Стерильные растворы для инъекций можно приготовить путем включения mAb или его фрагментов в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или

комбинацией ингредиентов, например как указано выше, при необходимости с последующей стерилизацией микрофильтрацией. Как правило, дисперсии готовят путем введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсную среду и другие требуемые ингредиенты из тех, что перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов, предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые дают на выходе порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный требуемый ингредиент из его предварительно стерильно фильтрованного раствора.

Пролонгированная абсорбция инъекционных mAb против C2 или их фрагментов может быть достигнута путем включения в композицию агента, замедляющего абсорбцию, например, солей моностеарата и желатина.

mAb или их фрагменты могут быть приготовлены вместе с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, такими как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микрокапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы приготовления таких составов, как правило, хорошо известны специалистам в данной области. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Фармацевтические композиции можно вводить с помощью медицинских устройств, известных в данной области.

Схемы дозировки корректируются для обеспечения оптимального требуемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, может быть введен одиночный болюс, могут быть введены несколько доз в течение периода времени или дозы могут быть пропорционально уменьшены или увеличены в зависимости от потребностей терапевтической ситуации.

Фактические уровни дозировки mAb или их фрагментов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьироваться с получением количества активного ингредиента, которое эффективно для достижения требуемого терапевтического ответа для конкретного пациента, не будучи токсичным для пациента.

В одном варианте осуществления моноклональные антитела по изобретению можно вводить путем инфузии с недельной дозировкой от 10 до 500 мг/м², например от 200 до 400 мг/м². Такое введение можно повторять, например, 1-8 раз, например 3-5 раз. Введение может осуществляться путем непрерывной инфузии в течение периода от 2 до 24 часов, как например, от 2 до 12 часов.

Еще в одном варианте осуществления mAb или их фрагменты или любые другие связывающие молекулы, раскрытые в настоящем изобретении, можно вводить в качестве поддерживающей терапии, например, один раз в неделю в течение 6 месяцев или более.

Настоящее изобретение теперь будет проиллюстрировано со ссылкой на следующие примеры, которые представляют особенно выгодные варианты осуществления. Однако следует отметить, что эти варианты осуществления являются просто иллюстративными и никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие изобретение.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Удаление сайта гликозилирования из моноклонального антитела против C2b.

BRO2-glyc-IgG4

Патент США № 9944717 раскрывает мышинное ингибирующее моноклональное антитело против C2b (mAb). На основе этого руководства были созданы четыре гуманизированных варианта, включающие различные вариабельные домены тяжелой цепи (VH1, VH2, VH3 или VH4) и вариабельные домены легкой цепи каппа (VK1, VK2, VK3 или VK4) с использованием технологии Composite Human Antibody, разработанной Antitope Ltd (Кембридж, Великобритания). На основании анализа *in silico* был предсказан риск иммуногенности для каждой из гуманизированных последовательностей VH и VK. Как показано в Таблице 7, самый низкий риск иммуногенности, наряду с наивысшим процентом идентичности ближайшему варианту зародышевой линии человека, был предсказан, когда VH4 был спарен с VK3 или VK4. Это наблюдение было основано на самом низком количестве беспорядочного связывания пептидов с белками МНС класса II человека. VH4 была предпочтительнее из-за ее более высокого процента идентичности с ближайшей зародышевой линией человека. Кроме того, на основании связывания и активности пара VH4/VK3 была выбрана в качестве гуманизированного ведущего антитела против C2b человека и упоминается в настоящем описании как BRO2-glyc-IgG4.

Таблица 7. Риск иммуногенности от 1 (= самый низкий) до 5 (= самый высокий) (приоритет высокой аффинности над умеренной) и идентичность последовательности ближайшей зародышевой линии человека

VH	Высокая аффинность	Умеренная аффинность	Ранжирование	Идентичность с IGHV1-8*01	VL	Высокая аффинность	Умеренная аффинность	Ранжирование	Идентичность с IGKV4-1*01
WT	1	2	5	79,3%	WT	6	5	5	80,0%
VH1	0	3	4	86,2%	VK1	3	3	3	92,5%
VH2	0	2	1	90,8%	VK2	3	3	3	95,0%
VH3	0	2	1	93,1%	VK3	3	2	1	96,3%
VH4	0	2	1	95,4%	VK4	3	2	1	97,5%

Анализ SDS-PAGE вариантов BRO2-glyc-IgG4 выявил двойную полосу и сдвиг полосы в вариантах VH3 и VH4. Предположили, что этот сдвиг возникает из-за потенциального сайта гликозилирования (мотив NXS) на остатках 72-74 (нумерация по Kabat) в каркасной области 3 (FR3) VH3 и VH4. Поскольку этот потенциальный сайт

гликозилирования может приводить к гетерогенности не только продукта антитела, экспрессируемого из клеточных линий млекопитающих, но также и функции антитела, потенциальный сайт гликозилирования был удален. Сайт гликозилирования был удален с помощью сайт-направленного мутагенеза с образованием варианта VH N72D, называемого здесь либо VH3.2, либо VH4.2. Мутация N72D удалила измененный профиль полос, наблюдаемый в VH3 и VH4 (Фиг. 1), подтверждая, что двойная полоса и сдвиг полосы были вызваны гликозилированием и гетерогенностью тяжелой цепи.

Чтобы дополнительно определить, демонстрирует ли вариант VH4.2, который является тем же VH, что и BRO2-glyc-IgG4, но без сайта гликозилирования в FR3, улучшенные характеристики по сравнению с гетерогенно гликозилированным исходным mAb BRO2-glyc-IgG4, определяли термоустойчивость каждого антитела.

Для проверки термоустойчивости гуманизированные варианты обрабатывали при повышении температуры от 55°C до 75°C с помощью термоциклера (Biometra). Остаточную связывающую способность анализировали на Biacore 3000 на чипе CM5, непосредственно покрытом человеческим C2, очищенным из сыворотки (3500 RU, Complement Technologies кат. # A112, лот # 20). Данные анализировали с использованием программного обеспечения BIAevaluation. Угловой коэффициент специфического связывания каждого варианта определяли с помощью программного обеспечения BIAevaluation, общее соответствие линейной фазы сенсограммы (начало через 5 секунд после начала инъекции и прекращение через 11 секунд). Затем рассчитывали процент активности, используя среднее значение углового коэффициента, полученное для температур 59 °C, 56,9 °C, 55°C и 4°C как 100% активности. Наконец, процент активности наносили на график в GraphPad Prism (логарифм (агонист) против ответа, переменное значение углового коэффициента (4 параметра)). Температура, при которой антитело потеряло 50% своей связывающей способности (TM50), показана в Таблице 8 ниже.

BRO2-IgG4

Оба варианта без сайта гликозилирования, присутствующего в BRO2-glyc-IgG4, продемонстрировали улучшенную термоустойчивость (Таблица 8). BRO2-glyc-IgG4 показал TM50 64 °C. VH4.2/VK3 (также называемый здесь BRO2-IgG4) показал TM50 65 или 65,1°C в двух независимых экспериментах. VH4.2/VK4 показал TM50 65,2 или 65,4°C в двух независимых экспериментах.

Таблица 8. Процент идентичности ближайшим последовательностям зародышевой линии человека и термоустойчивость моноклональных антител против C2b

	BRO2-glyc-IgG4	VH4.2/VK3 (BRO2-IgG4)	VH4.2/VK4
% Идентичности с ближайшими человеческими зародышевыми последовательностями	95,8	95,3	95,9
% Гомологии с ближайшими человеческими зародышевыми последовательностями	97,0	97,0	97,6

Термоустойчивость (TM50, °C)	64,0	65,0; 65,1	65,2; 65,4
------------------------------	------	------------	------------

Пример 2: Получение вариантов негликозилированного IgG4 и негликозилированного IgG1

BRO2-IgG4-NH

Антитела с pH-зависимым связыванием антигена диссоциируют от связанного антигена в кислых эндосомах после интернализации в клетках. Следовательно, высвобожденный антиген попадает в лизосому и разрушается, тогда как диссоциированное антитело, свободное от антигена, возвращается обратно в плазму с помощью FcRn. Рециркулированное свободное антитело может связываться с другим антигеном-мишенью. Повторяя этот цикл, pH-зависимое антигенсвязывающее антитело может связываться с антигеном-мишенью более одного раза и, следовательно, улучшать нейтрализующую способность антитела. Этот процесс может быть дополнительно улучшен, если антитело оснащено технологией NHance® (NH) (argenx, Бельгия), которая усиливает связывание антитела с FcRn при кислом эндосомном pH (pH 6,0), но не при нейтральном pH (pH 7,4). Следовательно, аминокислоты в Fc-области BRO2-IgG4 были подвергнуты мутации, чтобы изменить pH-зависимое связывание с FcRn (H433K, N434F). Полученное антитело обозначается в настоящем описании как BRO2-IgG4-NH.

BRO2-IgG1-NH и BRO2-IgG1-LALA-NH (ARGX-117)

Также изучали влияние подкласса иммуноглобулинов на эффективность. Другой вариант NHance® получали на фоне человеческого IgG1 (BRO2-IgG1-NH). Эффекторные функции антитела могут быть дополнительно ослаблены мутациями в Fc-области, которые изменяют связывание антитела с Fcγ-рецепторами. Следовательно, аминокислотные замены L234A и L235A («LALA») были включены в BRO2-IgG1-NH с образованием BRO2-IgG1-LALA-NH, также называемого здесь ARGX-117.

His1-IgG1-LALA-NH

Чтобы определить, можно ли улучшить pH-зависимость BRO2-IgG1-LALA-NH, чтобы расширить его фармакокинетические и фармакодинамические (PK/PD) эффекты *in vivo*, аминокислота в VK антитела BRO2-IgG1-LALA-NH была мутирована на гистидин (G29H, мутант VK, обозначаемый здесь как Vk3m3). Полученное антитело обозначается здесь как His1-IgG1-LALA-NH.

His1-IgG4

Аналогичным образом, чтобы определить, может ли pH-зависимость BRO2-IgG4 быть улучшена для увеличения его PK/PD-эффектов *in vivo*, аминокислота в VK антитела BRO2-IgG4 была мутирована на гистидин (G29H, мутант VK, обозначаемый здесь как Vk3m3). Полученное в результате антитело (VH4.2/Vk3m3) обозначается здесь как His1-IgG4.

His1-IgG4-NH

Чтобы изучить влияние рециркуляции на эффективность антител, мутации NHance® были включены в антитело His1-IgG4 (VH4.2/Vk3m3). Полученное антитело обозначается здесь как His1-IgG4-NH.

His2-IgG4-NH

Чтобы определить, может ли pH-зависимость BRO2-IgG4-NH быть улучшена для увеличения его PK/PD-эффектов *in vivo*, аминокислота VH4 антитела BRO2-IgG4-NH была мутирована на гистидин (K26H, мутант VH, обозначенный здесь как VH4.2m12). Кроме того, легкая цепь VK3 антитела BRO2-IgG4-NH была заменена легкой цепью VK4, упомянутой выше, и вторая аминокислота была мутирована на гистидин (G29H, мутант VK4, обозначенный здесь как VK4m3). Полученное антитело (VH4.2m12/VK4m3) обозначается здесь как His2-IgG4-NH.

Пример 3: Повышение эффективности негликозилированных вариантов BRO2

Общая фармакокинетика (PK)

Яванские макаки (n=2, 1 самец и 1 самка на группу) были случайным образом разделены на отдельные группы обработки в соответствии с Таблицей 9 ниже.

Таблица 9. Назначения группам обработки

Таблица 9 Группа	Антитело	Животное No.
1	BRO2 glyc-IgG4	1 2
2	Отрицательный контроль	3 4
3	BRO2-IgG4	5 6
4	BRO2-IgG4-NH	7 8
5	BRO2-IgG1-LALA-NH	9 10
6	His1-IgG4	11 12
7	His1-IgG4-NH	13 14
8	His1-IgG1-LALA-NH	15 16
9	His2-IgG4-NH	17 18

Образец сыворотки получали от каждой обезьяны за день до получения тестируемого антитела (день -1, или «PRE»). Затем в день 1 (д1) каждой обезьяне вводили однократную внутривенную инъекцию тестируемого антитела 5 мг/кг в соответствии с Таблицей 9. Затем образцы сыворотки получали от каждой обезьяны серийно в течение до 60 дней (до д60).

Для PK общего антитела (общая PK) на микропланшет наносили покрытие в течение ночи при 4°C 100 мкл козьего антитела против человеческого IgG (Bethyl; A80-319A) в концентрации 5 мкг/мл. Планшеты промывали 3 раза по меньшей мере 200 мкл PBS-0,05% Tween20 и затем блокировали 200 мкл PBS-2% BSA в течение 2 часов при комнатной

температуре (RT). После трехкратной промывки планшетов, по меньшей мере, 200 мкл PBS-0,05% Tween20, образцы сыворотки, стандартные образцы и образцы QC (полученные в объединенной интактной сыворотке яванской макаки) наносили в двух экземплярах при 100-кратном разведении или более и разбавляли в 100 мкл PBS - 0,2% BSA - 1% объединенной интактной сыворотке яванского макака. Для каждого антитела были применены его собственные замороженные стандарты и образцы QC в двух экземплярах (та же партия антитела была использована в качестве партии, которую вводили обезьянам). Антитело отрицательного контроля представляет собой антитело, которое связывается с компонентом комплемента, не относящимся к C2. Инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 2 часов при встряхивании планшета. После 5-кратной промывки планшетов, по меньшей мере, 200 мкл PBS-0,05% Tween20, 100 мкл пероксидазы хрена (HRP), меченные мышиными антителами к человеческому IgG каппа (Southern Biotech, 9230-05), разбавляли в 260 000 раз в PBS 0,2% BSA и наносили в лунки на 1 час при комнатной температуре. Планшеты промывали 5 раз по меньшей мере 200 мкл PBS-0,05% Tween20 и окрашивали 100 мкл 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (TMB) и останавливали через 10 минут 100 мкл 0,5 М H₂SO₄ (CHEM LAB, кат. № CL05-2615-1000). OD измеряли при 450 нм, и GraphPad Prism использовали для обратного расчета концентрации образцов (каждый с использованием своего стандарта).

Результаты показаны в Таблице 10, а сравнение гликозилированного BRO2-glyc-IgG4 с негликозилированным BRO2-IgG4 показано на Фиг.2. В анализе общей РК концентрации негликозилированного BRO2-IgG4 обычно были выше, чем концентрации гликозилированного BRO2-glyc-IgG4. Это улучшение общей РК было совершенно неожиданным и представляет собой важное дополнительное преимущество негликозилированного антитела.

Таблица 10. Общая РК

	Общая РК (мкг/мл)							
	BRO2-glyc-IgG4				BRO2-IgG4			
	Обезьяна 1	Обезьяна 2	среднее M1&M 2	Станд. Откл.	Обезьяна 5	Обезьяна 6	среднее M5&M 6	Станд. Откл.
15 мин	107,1	99,9	103,4	5,3	167,0	166,7	162,5	5,6
1 ч	103,9	99,9	102,2	1,7	172,9	158,4	168,1	13,3
2 ч	95,4	89,0	94,8	2,8	151,1	150,9	147,6	3,8
4 ч	91,4	92,2	90,0	2,5	134,6	132,3	132,7	1,2
6 ч	86,5	86,0	85,4	1,6	134,3	128,9	133,6	5,5
24 ч	56,1	55,5	58,3	1,2	99,6	97,6	85,9	1,9
День 2	47,9	47,2	47,3	0,6	77,6	78,3	68,7	9,3
День 4	34,8	39,8	34,1	2,7	58,4	55,8	60,8	4,8
День 7	26,6	25,1	26,0	0,6	41,5	33,6	34,9	7,6

День 11	16,3	14,1	16,2	1,3	28,1	20,9	24,5	5,1
День 15	9,8	8,1	9,3	0,9	18,1	11,2	13,0	5,1
День 19	6,7	5,1	6,5	1,1	12,8	6,5	8,3	2,5
День 23	4,4	3,2	4,4	0,8	9,8	4,3	7,1	3,9
День 27	3,2	1,9	3,1	0,7	6,5	2,2	3,9	3,0
День 31	2,2	1,5	2,3	0,4	4,7	1,0	2,9	2,6

Свободный C2

Яванские макаки (n=2, 1 самец и 1 самка на группу) получали однократную внутривенную инъекцию тестируемого антитела в дозе 5 мг/кг, как описано выше.

В этом анализе на микропланшет наносили покрытие в течение ночи при 4°C 100 мкл 2,5 мкг/мл мышинового моноклонального антитела против C2 человека mAb32 (anti-C2 # 32 m-IgG @ 3,31 мг/мл, 0,2 мкм PBS, LC-12/05-166, 12-апр-13). Это антитело связывается с эпитопом C2, отличным от BRO2. Планшеты промывали 3 раза по меньшей мере 200 мкл PBS-0,05% Tween20 и затем блокировали 200 мкл PBS-2% BSA (pH 7,4) в течение 2 часов при комнатной температуре. Тем временем образцы, замороженный стандарт (специфичный для каждого антитела, приготовленный в объединенной интактной сыворотке яванского макака) и замороженные образцы QC (приготовленный в объединенной интактной сыворотке яванского макака) размораживали и разводили в 6,7 раза в 80 мкл PBS-0,2% BSA. Добавляли 40 мкл биотинилированного анти-C2 VH4/VK3 при 0,6 мкг/мл. Каждый образец готовили в двух экземплярах. 100 мкл смеси сразу переносили на промытый планшет с покрытием после добавления биотинилированного антитела. Планшет инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре, промывали 5 раз по меньшей мере 200 мкл PBS-0,02% Tween20 и добавляли 100 мкл strep-HRP (Jackson, 016-030-084) при 300000-кратном разведении в PBS-0,2% BSA. После 1 часа инкубации при комнатной температуре планшеты промывали 5 раз, по меньшей мере, 200 мкл PBS-0,05% Tween20 и окрашивали 100 мкл TMB (Calbiochem, CL07) и останавливали через 10 минут 100 мкл 0,5 M H₂SO₄ (CHEM LAB., кат. № CL05-2615-1000). OD измеряли при 450 нм и использовали для определения уровня C2.

Сыворотки следующих обезьян сначала были протестированы вместе с использованием анализа свободного C2, проведенного в разные дни: обезьяны 1 и 2; обезьяны 3 и 4; обезьяны 5 и 6; обезьяны 7, 8, 9 и 10; обезьяны 11, 12, 15 и 16; и обезьяны 13, 14, 17 и 18.

Уровни свободного C2 для всех обезьян показаны на Фиг. 3А-3И и в Таблице 11.

Как и ожидалось, у обезьян 3 и 4 не было снижения уровня свободного C2, поскольку этим обезьянам вводили дозу антитела отрицательного контроля. Для всех обезьян, получавших варианты BRO2, уровни свободного C2 были очень низкими только после 2-го дня.

Для обезьян, получавших BRO2-glyc-IgG4 (обезьяны 1 и 2) и BRO2-IgG4 (обезьяны 5 и 6), уровни C2 снова поднялись, начиная с 4-го дня, и вернулись к исходным уровням к дню 31. Обезьяны 5 и 6, обработанные негликозилированным антителом, постоянно демонстрировали более низкие уровни свободного C2, чем обезьяны, обработанные BRO2-glyc-IgG4 (Фиг. 3С, Таблица 11).

Для всех других обезьян, за исключением тех, у кого есть антитела против лекарственных средств (ADA, отмечены * на Фиг. 3D-3I), уровни C2 увеличивались намного медленнее, а уровни C2 не возвращались к исходному уровню даже к 31 дню.

На Фиг. 4 показано увеличение (логарифмическая шкала) уровня свободного C2 (OD 450 нм) для среднего значения для 2 обезьян в каждой группе. Уровни свободного C2 были ниже для вариантов BRO2, чем для вариантов His1.

Обезьяна 10, которой инъецировали BRO2-IgG1-LALA-NH (ARGX-117), имела самый низкий уровень C2 во все тестируемые моменты времени. Сравнение уровня свободного C2 от обезьян 5 и 6, 9 и 10, 15 и 16 до 60 дней можно увидеть на Фиг.5. Обезьяна 10 также имела лучшую общую РК (см. выше). Необработанные данные показаны в Таблице 11, а средние данные, сравнивающие гликозилированные и негликозилированные варианты, показаны в Таблице 12.

Таблица 11. Свободный C2 (OD450 нм) для всех антител

Мо мен т Вре мен и	O 1	O 2	O 3	O 4	O 5	O 6	O 7	O 8	O 9	O 10	O 11	O 12	O 13	O 14	O 15	O 16	O 17	O 18
Ден ь -5	0,77 3	0,77 0	0,79 7	0,93 0	0,69 6	0,70 5	0,43 9	0,53 2	0,60 2	0,62 6	0,65 6	0,64 3	0,82 4	0,80 5	0,756	0,755	0,789	0,935
Ден ь 0	0,70 7	0,71 6	0,81 3	0,90 7	0,74 0	0,65 7	0,50 7	0,53 1	0,57 8	0,60 4	0,62 0	0,68 7	0,84 7	0,79 2	0,772	0,750	0,834	1,043
15 ми н	0,03 1	0,02 8	0,87 9	0,97 9	0,01 6	0,01 8	0,01 6	0,01 4	0,01 5	0,01 3	0,02 9	0,03 3	0,03 2	0,03 8	0,033	0,028	0,050	0,055
1 ч	0,03 3	0,02 8	0,91 4	1,05 5	0,01 7	0,02 1	0,01 4	0,01 3	0,01 4	0,01 3	0,03 0	0,03 3	0,03 5	0,03 7	0,034	0,031	0,050	0,062
2 ч	0,03 4	0,03 0	0,87 4	0,99 7	0,01 8	0,02 0	0,01 6	0,01 4	0,01 5	0,01 5	0,03 1	0,03 1	0,03 4	0,04 3	0,034	0,030	0,052	0,063
4 ч	0,03 3	0,02 7	0,88 7	1,00 0	0,01 7	0,02 0	0,01 7	0,01 5	0,01 6	0,01 6	0,03 7	0,03 4	0,03 6	0,04 4	0,037	0,032	0,054	0,062
6ч	0,03 4	0,03 0	0,95 8	1,03 5	0,01 5	0,01 9	0,01 5	0,01 4	0,01 5	0,01 7	0,03 2	0,03 4	0,03 5	0,04 3	0,034	0,034	0,052	0,071
Ден ь 1	0,04 6	0,04 5	0,91 7	0,92 3	0,02 1	0,02 5	0,01 9	0,01 8	0,02 0	0,02 0	0,04 1	0,03 8	0,04 6	0,05 4	0,048	0,044	0,064	0,084
Ден ь 2	0,06 0	0,06 1	0,87 2	0,92 0	0,02 7	0,03 0	0,02 1	0,01 8	0,02 3	0,02 2	0,07 5	0,04 0	0,05 0	0,05 2	0,053	0,043	0,068	0,090
Ден ь 4	0,12 5	0,10 2	0,83 3	0,88 6	0,03 7	0,04 8	0,02 6	0,02 1	0,03 5	0,02 4	0,08 8	0,05 6	0,06 3	0,06 4	0,056	0,055	0,080	0,096
Ден ь 7	0,17 4	0,16 9	0,85 3	0,89 9	0,07 2	0,11 0	0,03 3	0,02 5	0,05 0	0,02 8	0,11 9	0,08 5	0,07 5	0,07 5	0,070	0,071	0,080	0,099
Ден ь 11	0,25 7	0,26 5	0,86 2	0,84 7	0,12 7	0,19 3	0,05 0	0,03 3	0,09 2	0,03 3	0,17 2	0,10 5	0,08 8	0,08 8	0,090	0,087	0,102	0,134
Ден	0,36	0,37	0,84	0,83	0,17	0,29	0,06	0,04	0,13	0,04	0,31	0,13	0,08	0,09	0,094	0,109	0,133	0,147

ь 15	4	5	0	4	7	0	5	3	8	3	5	8	6	6				
Ден ь 19	0,41 8	0,47 1	0,80 7	0,86 4	0,25 6	0,40 6	0,08 3	0,03 1	0,19 4	0,05 1	0,28 9	0,15 7	0,15 7	0,10 6	0,113	0,127	0,143	0,167
Ден ь 23	0,51 7	0,56 2	0,82 0	0,89 7	0,32 7	0,46 9	0,10 0	0,05 9	0,25 5	0,06 2	0,35 1	0,22 5	0,33 9	0,13 3	0,126	0,148	0,176	0,192
Ден ь 27	0,59 7	0,63 3	0,81 8	0,92 1	0,37 8	0,53 7	0,12 4	0,14 6	0,29 2	0,07 1	0,41 8	0,23 0	0,49 2	0,25 5	0,140	0,170	0,199	0,231
Ден ь 31	0,63 3	0,66 3	0,84 1	0,93 4	0,43 1	0,59 9	0,15 3	0,12 5	0,36 4	0,09 8	0,51 1	0,28 0	0,60 5	0,52 2	0,163	0,205	0,238	0,244

Таблица 12. Среднее значение свободного C2 гликозилированных и негликозилированных антител

	Свободный C2 (OD 450nm)							
	BRO2-glyc-IgG4				BRO2-IgG4			
	Обезья на 1	Обезья на 2	среднее M1&M 2	Станд. Откл.	Обезья на 5	Обезья на 6	среднее M5&M 6	Станд. Откл.
День -5	0,773	0,77	0,772	0,002	0,696	0,705	0,701	0,006
День 0	0,707	0,716	0,712	0,006	0,74	0,657	0,699	0,059
15 мин	0,031	0,028	0,030	0,002	0,016	0,018	0,017	0,001
1 ч	0,033	0,028	0,031	0,004	0,017	0,021	0,019	0,003
2 ч	0,034	0,03	0,032	0,003	0,018	0,02	0,019	0,001
4 ч	0,033	0,027	0,030	0,004	0,017	0,02	0,019	0,002
6 ч	0,034	0,03	0,032	0,003	0,015	0,019	0,017	0,003
День 1	0,046	0,045	0,046	0,001	0,021	0,025	0,023	0,003
День 2	0,06	0,061	0,061	0,001	0,027	0,03	0,029	0,002
День 4	0,125	0,102	0,114	0,016	0,037	0,048	0,043	0,008
День 7	0,174	0,169	0,172	0,004	0,072	0,11	0,091	0,027
День 11	0,257	0,265	0,261	0,006	0,127	0,193	0,160	0,047
День 15	0,364	0,375	0,370	0,008	0,177	0,29	0,234	0,080
День 19	0,418	0,471	0,445	0,037	0,256	0,406	0,331	0,106
День 23	0,517	0,562	0,540	0,032	0,327	0,469	0,398	0,100

Поскольку эти анализы для различных только что описанных обезьян проводились в разные дни, анализ был повторен для выбранного количества временных точек (до заданных моментов времени, 4 часа, дни 1, 2, 4, 11 и 27), где сыворотки от всех обезьян использовали на одном планшете (Фиг. 6A-6D). Предварительные образцы также тестировали с добавлением избытка BRO2 (500 мкг/мл) и без него.

OD предварительных образцов были сопоставимы для всех обезьян, что указывает на то, что уровень свободного C2 у разных обезьян был сопоставим (Фиг. 6A). Когда преобразцы предварительно инкубировали с 500 мкг/мл BRO2, все сигналы упали до OD 0,013-0,015 (Фиг. 6A и 6B). Такие низкие значения OD не были получены ни для одного из образцов РК, что указывает на то, что ни в какой момент времени свободный C2 не истощался полностью. Самые низкие уровни были получены через 4 часа, и они были самыми низкими (OD от 0,02 до 0,03) для вариантов BRO2 (обезьяны 5, 6, 7, 8, 9 и 10, Фиг.

6C). Интерпретации результатов на 11-й и 27-й день мешали ADA (антитела против лекарственных средств), которые наблюдались у нескольких обезьян (Фиг. 6D).

Иммуногенность

Яванские макаки (n=2, 1 самец и 1 самка на группу) получали однократную внутривенную инъекцию тестируемого антитела в дозе 5 мг/кг, как описано выше. Образцы сыворотки, полученные от всех обезьян, тестировали на ADA (антитела против лекарственных средств) от исходного уровня (до воздействия) до 31 дня (Фиг. 7A-7P), а образцы сыворотки, полученные от обезьян 5 и 6, 9 и 10, 15 и 16, дополнительно тестировали до 59 дня (Фиг. 8A-8F).

Иммуногенность определяли путем нанесения на микропланшет покрытия в виде 100 мкл 1 мкг/мл соответствующего антитела в течение ночи при 4 °C. Планшеты промывали 3 раза по меньшей мере 200 мкл PBS-0,05% Tween20 и затем блокировали 200 мкл PBS-1% казеина в течение 2 часов при комнатной температуре. После трехкратной промывки планшетов по меньшей мере 200 мкл PBS-0,05% Tween20 образцы сыворотки разбавляли в 20 или более раз в 100 мкл PBS-0,1% казеина и инкубировали в лунках с покрытием в течение 2 часов при комнатной температуре (RT). После 5-кратной промывки планшетов по меньшей мере 200 мкл PBS-0,05% Tween20 в лунки добавляли 100 мкл антитела против обезьяньего IgG-HRP (Southern Biotech # 4700-05) в 8000-кратном разведении в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали 5 раз по меньшей мере 200 мкл PBS-0,05% Tween20 и окрашивали 100 мкл TMB и останавливали через 10 минут 100 мкл 0,5 M H₂SO₄ (CHEM LAB, кат. № CL05-2615-1000). OD измеряли при 450 нм. Репрезентативные результаты показаны на Фиг. 7A-7P.

Четкий ответ ADA наблюдался у обезьян 8 (BRO2-IgG4-NH), 11 (His1-IgG4), 13 и 14 (His1-IgG4-NH) и 16 (His1-IgG1-LALA-NH) (Фиг. 7F, 7I, 7K и 7L и 7N, соответственно). Действительно, сигнал, полученный в ИФА после инъекции антитела, по сравнению с исходным («PRE») сигналом (до инъекции антитела) увеличивался по меньшей мере в 2 раза.

Для обезьян 11, 13 и 16 (Фиг. 7I, 7K и 7N, соответственно), ADA наблюдались с 11-го дня; для обезьяны 8 (Фиг. 7F) - с 15-го дня; а для обезьяны 14 (Фиг. 7L) - на 19 день.

Для обезьяны 9 (BRO2-IgG1-LALA-NH) (Фиг. 7G) увеличение сигнала наблюдалось для всех образцов после инъекции антитела, но сигнал в исходном образце уже был высоким, а увеличение с течением времени было низким (примерно в 1,5 раза).

Для обезьяны 5 (Фиг. 7C) в исходном образце перед инъекцией антитела наблюдался необычно высокий сигнал. Этот сигнал также был выше, чем сигналы более поздних временных точек. Это можно объяснить интерференцией антитела (присутствующего в сыворотке) с анализом. Поэтому было невозможно определить, была ли реакция ADA у этой обезьяны.

Пример 4: Изoeлектрическая точка (pI)

Igawa et al. (Protein Eng Des Sel 2010, 23 (5): 385-392), изучая мутанты VH некоторых моноклональных антител IgG1, сообщили о сильной положительной корреляции между

изоэлектрической точкой (pI) и клиренсом моноклональных антител и отрицательной корреляции между pI и периодом полужизни моноклональных антител. В этом примере определяли pI различных форм антитела против C2b человека. Результаты представлены в Таблице 13.

Таблица 13. Кажущаяся pI моноклональных антител против C2b человека

	Пик	VH4,2-IgG4-IAP2VK3	VH4,2-IgG4-HN-IAP2VK3	VH4,2-IgG1-LALA-HN-IAP2VK3 (ARGX-117)
Рассчитанная кажущаяся pI n=3	Кислый 3	7,02	7,14	
	Кислый 2	7,10	7,24	
	Кислый 1	7,16	7,32	8,29
	Главный пик	7,20	7,35	8,43
	Основной 1	7,30	7,45	8,57
	Основной 2	7,42	7,58	

Все три протестированных антитела не имеют гликозилирования в VH. Как показано в Таблице 13, было обнаружено, что pI ARGX-117 значительно выше, чем pI близкородственных антител IgG4. Ожидается, что наблюдаемая pI ARGX-117 будет проявляться как повышенный потенциал для так называемого широкого охвата антигенов.

Пример 5: Картирование доменов с помощью вестерн-блоттинга и анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

Характеристики связывания ARGX-117 оценивали с помощью вестерн-блоттинга и анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR), как показано на Фигуре 1. Результаты вестерн-блоттинга показали, что ARGX-117 связывается с C2 и C2b, как показано на Фигуре 9А. Характеристики связывания ARGX-117 были дополнительно изучены с помощью SPR с использованием Biacore 300 путем покрытия C2 (SEQ ID NO: 21) на твердую подложку с использованием различных концентраций Fab-фрагментов ARGX-117, используемых в качестве элюата, как показано на Фигуре 9В. Аффинности рассчитывали, предполагая связывание 1:1 между Fab и C2, и получали Kd примерно 0,3 нМ. Чтобы изучить механизм действия ARGX-117, проводили анализ SPR, имитирующий образование C3-конвертазы (C4bC2a) с биотинилированным C4, иммобилизованным на чипах, покрытых стрептавидином, как показано на Фигуре 9С. Когда C2 добавляли в проточный буфер отдельно или предварительно инкубировали с контрольным mAb, на чипе наблюдали связывание C2. Предварительная инкубация с клоном 63 антитела против C2 (т.е. анти-C2-63) привела к более высокому сигналу, предположительно потому, что эта форма mAb образовала комплекс с C2 и комплексы C2:mAb связываются вместе, что приводит к более высокой молекулярной массе и более высокому сигналу SPR. Когда C2 предварительно инкубировали с ARGX-117, связывание C2 с C4b значительно снижалось. Считается, что начальное взаимодействие C2 с C4b инициируется доменом C2b (SEQ ID NO: 44). После этого вступает большой домен C2a (SEQ ID NO: 43), и это взаимодействие имеет решающее значение для образования комплекса конвертазы C3. Результаты этого

эксперимента предполагают, что ARGX-117 ингибирует C2, ингибируя связывание с C4b.

Чтобы лучше понять механизм действия ингибирования C2 с помощью ARGX-117, C2 сначала позволили связываться с C4b, иммобилизованным на стрептавидиновых чипах, и после стабилизации только проточным буфером образцы наносили, как показано на Фигуре 9D. Рабочий буфер или контрольное mAb IgG4 человека, нацеленное на нерелевантный растворимый антиген (т.е. антитела против фактора XI (анти-FXI)), приводил к некоторому снижению сигнала, которое нормализовалось после прекращения инъекции. Инъекция анти-C2-63 приводила к усилению сигнала, предполагая, что это mAb способно связываться с конвертазой C3 (C4bC2a). Это согласуется с предсказанной моделью связывания C2 с C4b, которая предполагает, что после связывания с C2 домен C2a все еще в значительной степени доступен. Интересно, что ARGX-117 продемонстрировал сильное связывание с конвертазой C3, за которым следовала быстрая диссоциация. Эти результаты предполагают, что ARGX-117 способно связываться с C2, но это связывание очень нестабильно, вероятно, влияя на C2 таким образом, чтобы облегчить активацию. Эти результаты также предполагают, что ARGX-117 будет высвобождаться вместе с C2b из молекулы C2.

Пример 6: Картирование доменов с использованием мутантов с обменом доменами между C2 и Фактором В

Для картирования эпитопа анти-C2-5F2.4 было использовано преимущество того факта, что анти-C2-5F2.4 не является перекрестно реактивным с фактором В (FB; SEQ ID NO: 50) и что C2 и FB представляют собой высокоомологичные белки, имеющие сходную доменную структуру. Оба белка содержат небольшой фрагмент и большой фрагмент. Небольшой фрагмент в белке компонента C2 называется C2b (SEQ ID NO: 44), а небольшой фрагмент в факторе В называется FBa (SEQ ID NO: 51). Небольшой фрагмент в каждом содержит три Sushi-домена (CCP-домены). Большой фрагмент в каждом из них содержит домен типа А фактора фон Виллебранда (VWFA) и домен пептидазы S1, как показано на Фиг.10. Мутанты с заменой домена включали С-концевой фрагмент FLAG.

Для создания различных обменных мутантов из GenScript были получены конструкции ДНК для C2, FB и десять мутантов с заменой доменов. ДНК трансформировали с использованием теплового шока в компетентные клетки *E. coli* (ThermoFisher). Клетки высевали на чашки с агаром и выращивали в течение 16 часов при 37 °C. Готовили тринадцать бутылок 200 мл среды LB (Luria Broth) (MP Bio) и автоклавируют. В каждый флакон добавляли 300 мкл ампициллина (100 мг/мл). Предварительные культуры начинали с 3 мл среды LB для каждой конструкции. Через 6 часов предварительные культуры переносили во флаконы и выращивали в течение 16 часов при 37°C при перемешивании. ДНК очищали от бактериальных осадков с помощью набора для очистки плазмидной ДНК в соответствии с инструкциями производителя (MaxiPrep, NucleoBond PC 500, Macherey-Nagel) и восстанавливали в буфере TE. Концентрацию плазмидной ДНК определяли с помощью NanoDrop и устанавливали на уровне 1 мкг/мкл. Целостность плазмид проверяли рестрикционным анализом. Для каждой конструкции

смешивали 1 мкл плазмидной ДНК и 9 мкл смеси рестрикционных ферментов (PstI и PvuII) и инкубировали в течение 2 часов при 37 °С. ДНК анализировали на 1% агарозном геле после 1 часа работы при 100 В с использованием системы Bio-Rad ChemiDoc MP. С конструкциями ДНК для точного картирования (см. ниже) обращались так же, но их целостность проверяли секвенированием.

Мутантные белки получали путем транзиторной трансфекции в клетках HEK293T. Клетки HEK культивировали в полной среде DMEM (DMEM (Gibco) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS) и 1% пенициллина/стрептомицина (P/S)). За день до трансфекции клетки из двух флаконов высевали в пятнадцать культуральных чашек по 10 см² (Greiner Bio-One). Перед трансфекцией 21 мл пустой среды DMEM смешивали с 630 мкл полиэтиленимина (P-Pei, Polysciences, Inc.). В качестве контроля трансфецировали пустую плазмиду PF45 pcDNA3.1 и PF146 H2B GFP. 15 мкг плазмидной ДНК инкубировали в 1500 мкл пустой смеси среда-P-Pei в течение 20 минут в пробирках Eppendorf. Смесь для трансфекции осторожно добавляли к клеткам и среду перемешивали пипетированием вверх и вниз. Через 8 часов среду заменили на 15 мл пустой среды. Через 3 дня клетки проверяли на экспрессию GFP с помощью флуоресцентного микроскопа. Супернатанты собирали на 4 день, стерилизовали фильтрованием через фильтр 0,22 мкм (Sartorius) и концентрировали на колонке Vivaspin (Sartorius) приблизительно до одной трети исходного объема. Мутанты с обменом доменов концентрировали на 30000 колонках MWCO, а мутанты C2b для точного картирования концентрировали на 10000 колонках MWCO. Все супернатанты хранили при -20°C и также анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн-блоттинга против FLAG.

Для проверки экспрессии различных конструкций проводили анализ ИФА против FLAG-tag. На микропланшеты (Maxisorp, NUNC, кат. № 439454) наносили покрытие в течение ночи в виде 100 мкл супернатантов HEK293T, 5-кратно разведенных в PBS или неразбавленных (для мутантов с обменом доменами и мутантов точного картирования, соответственно). После 4-кратной промывки PBS и 0,05% Tween-20 добавляли 100 мкл/лунку 1 мкг/мл антител против FLAG (клон M2, Sigma-Aldrich) в PBS и 0,1% Tween-20 (PBST) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре (RT) при перемешивании. В качестве антител для детектирования в PBST добавляли 100 мкл /на лунку меченного пероксидазой хрена (HRP) козьего антимышиного IgG (Santa Cruz Biotechnology, Cat # sc-2005, 1000-кратное разведение) в PBST и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После последней стадии промывки в качестве субстрата добавляли 100 мкл /на лунку TMB (Invitrogen, кат. № SB02), реакцию останавливали через несколько минут, добавляя 100 мкл /на лунку HCl (Fischer, кат. № J/4320/15) и поглощение считывали при 450 нм (BioRad, iMark Microplate reader).

ИФА с антителами против FLAG детектировал белки в супернатанте для всех мутантов, за исключением C2- (FB-Pep1), как показано на Фигуре 11. Различия между мутантами можно объяснить разным продуцированием или различной эффективностью детектирования mAb против FLAG после нанесения покрытия.

Затем исследовали распознавание обменных мутантов антителом против C2-5F2.4. Для этого на микропланшеты (Maxisorp, NUNC, кат. № 439454) наносили покрытие в течение ночи в виде 2 мкг/мл анти-C2-5F2.4 в 100 мкл PBS. Планшеты промывали 4 раза PBS с 0,05% Tween-20 и блокировали 200 мкл PBS с 0,1% Tween-20 с 1% бычьим сывороточным альбумином (BSA) (PBST-BSA) в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки 100 мкл культурального супернатанта, содержащего мутанты, добавляли в 20-кратном разведении в PBST-BSA и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре с перемешиванием. После промывки в качестве детектирующего антитела добавляли 1 мкг/мл биотинилированного антитела против FLAG (клон M2, Sigma-Aldrich) в PBST-BSA в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшет промывали и конъюгат стрептавидин-POD 1 мкг/мл (Roche, Cat # 11089153001) добавляли и инкубировали в темноте в течение 30 минут. Планшет промывали и добавляли 100 мкл /на лунку TMB (Invitrogen, № по каталогу SB02) в качестве субстрата, и реакцию останавливали через несколько минут, добавляя 100 мкл/лунку HCl (Fischer, № по каталогу J/4320/15). Поглощение измеряли при 450 нм на ридере для микропланшетов (BioRad, iMark Microplate reader).

C2 дикого типа демонстрировал четкое связывание, и потеря связывания наблюдалась только для C2- (FB-S2), в котором домен S2 комплемента C2 (SEQ ID NO: 46) был заменен доменом S2 фактора В (SEQ ID NO: 54). Напротив, связывание с FB дикого типа не наблюдалось, однако сильное связывание детектировали для мутантного FB- (C2-S2), в котором домен S2 фактора В (SEQ ID NO: 54) был заменен доменом S2 C2 комплемента (SEQ ID NO: 46), как показано на Фигуре 12. Эти результаты ясно показывают, что антитело против C2-5F2.4 распознает эпитоп на S2 (Sushi-домен 2) на C2b. Этот результат также показывает, что C2- (FB-Pep1) продуцируется в достаточном количестве. Аналогичные результаты были получены при использовании мышиного IgG2a-антитела против C2-5F2.4. Кроме того, аналогичные результаты были получены при изучении связывания в присутствии 1,25 mM Ca⁺⁺ в буфере. Картирование эпитопа, выполненное Bioceros BV с использованием мутантов с обменом доменами между C2 человека и C2 мыши, также привело к аналогичному выводу. Кроме того, аминокислотная последовательность Sushi-домена 2 C2 яванского макака полностью идентична Sushi-домену 2 C2 человека.

Пример 7: Точное картирование эпитопа антитела против C2-5F2.4 в Sushi-домене 2

Антитело против C2-5F2.4 не проявляет перекрестной реактивности с C2 мыши, и домен S2 мыши (SEQ ID NO: 58) отличается от домена S2 человека (SEQ ID NO: 46) по 10 положениям аминокислот, как показано на Фигуре 13. Чтобы исследовать, какая из этих десяти аминокислот отвечает за связывание mAb, были созданы мутанты точного картирования. Конструкции точного картирования содержали либо фрагмент C2b человека (huC2b), либо huC2b с мышинным S2 (huC2b-mS2), либо десять мутантов, каждый из которых содержал одну обратную мутацию аминокислоты из последовательности мыши в последовательность человека. Мутантные белки C2b были получены аналогично мутантам

с обменом доменами путем транзиторной трансфекции в клетки HEK293.

Все мутанты получали и детектировали с помощью ИФА с антителом против FLAG, как показано на Фигуре 14. Антитело против C2-5F2.4 связывалось с huC2b, но не с huC2b с мышинным S2 (huC2b-mS2), как и ожидалось. Ни одна из обратных точечных мутаций не восстанавливала связывание антитела против C2-5F2.4, что позволяет предположить, что эпитоп этого mAb состоит по меньшей мере из двух аминокислот в домене S2, как показано на Фигуре 15. Аналогичные результаты были получены при изучении связывания в присутствии 1,25 mM Ca⁺⁺ в буфере.

Используя общедоступные структурные данные для человеческого C2b, было проанализировано положение десяти возможных аминокислот, которые могут вносить вклад в эпитоп антитела против C2-5F2.4, как показано на Фигуре 16. Этот анализ выявил три возможных кластера, каждый из которых состоит из трех аминокислот, которые могут вносить вклад в эпитоп. Были сконструированы и получены конструкции ДНК для этих кластерных мутантов. Кластерные мутанты получали путем мутации аминокислот C2b S2 человека на соответствующие аминокислоты C2b S2 мыши. В каждом мутанте были изменены три аминокислоты. Потеря связывания ожидалась, если эти три аминокислоты вносили вклад в эпитоп антитела против C2-5F2.4. На фигуре 17А показано, что мутант кластера 1 хорошо экспрессируется и связывание не нарушается, и поэтому эти аминокислоты не участвуют в связывании. На основании анализа ИФА антитела против FLAG экспрессия мутанта кластера 2 была ниже, и это привело к отсутствию связывания антитела против C2-5F2.4. Мутант кластера 3 также плохо экспрессировался, и это, скорее всего, объясняет отсутствие связывания антитела против C2-5F2.4, как показано на Фигуре 17В. Аналогичные результаты были получены при изучении связывания в присутствии 1,25 mM Ca⁺⁺ в буфере. Из этого анализа можно исключить аминокислоты в кластере 1, оставив четыре возможных аминокислоты в кластере 2 и кластере 3.

Мутанты с обменом доменами обеспечили убедительные доказательства того, что эпитоп, который распознается антителом против C2-5F2.4 на C2, расположен в Sushi-домене 2 на C2b. Кроме того, эти эксперименты предполагают, что присутствие этого домена на FB достаточно для распознавания антитела против C2-5F2.4. Учитывая, что антитело против C2-5F2.4 не реактивно в отношении C2 мыши, одна или более из 10 аминокислот, которые различаются между доменами Sushi 2 человека и мыши, должны быть важны для эпитопа. Используя одиночные обратные мутации аминокислот, нами показано, что одна аминокислота в Sushi 2 не может восстановить связывание. Из экспериментов, проведенных с кластерными мутантами, был сделан вывод, что аминокислоты в кластере 1 не вносят вклад в эпитоп антитела против C2-5F2.4. Аминокислоты кластера 2 могут вносить вклад в эпитоп антитела против C2-5F2.4, но поскольку экспрессия этого мутанта была ниже, чем у мутанта кластера 1, нельзя исключить, что фолдинг мутанта кластера 2 не было оптимальным. Поскольку мутант кластера 3 не экспрессировался в достаточной мере, вероятно, мутации повлияли на фолдинг, и поэтому роль аминокислот в кластере 3 остается неясной.

Включение ссылкой

Все цитируемые здесь публикации и патентные документы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с фактором комплемента C2 человека, где указанное моноклональное антитело или его фрагмент содержит:

домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и
домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

2. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит полноразмерное моноклональное антитело.

3. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2, где моноклональное антитело содержит константный домен тяжелой цепи IgG человека.

4. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, где константный домен тяжелой цепи содержит константный домен тяжелой цепи IgG1 человека.

5. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 4, где константный домен тяжелой цепи IgG1 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

6. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, где константный домен тяжелой цепи содержит константный домен тяжелой цепи IgG4 человека.

7. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, где константный домен тяжелой цепи IgG4 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

8. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, где моноклональное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

9. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, где моноклональное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с фактором комплемента C2 человека, и фармацевтически приемлемый носитель, где указанное моноклональное антитело или его фрагмент содержит:

домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и
домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

11. Фармацевтическая композиция по п. 10, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит полноразмерное моноклональное антитело.

12. Фармацевтическая композиция по п. 10 или п. 11, где моноклональное антитело

содержит константный домен тяжелой цепи IgG человека.

13. Молекула нуклеиновой кислоты или множество молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9.

14. Вектор или множество векторов, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты или множество молекул нуклеиновой кислоты по п. 13.

15. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или множество молекул нуклеиновой кислоты по п. 13.

16. Клетка-хозяин, содержащая вектор или множество векторов по п. 14.

17. Клетка-хозяин по любому из пп. 14-16, где клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.

18. Способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий

культивирование популяции клеток-хозяев по любому из пп. 15-17 в условиях, подходящих для экспрессии моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и

выделение моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клеток.

19. Способ ингибирования классического пути активации комплемента у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9.

20. Способ ингибирования лектинового пути активации комплемента у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9.

21. Способ по п. 19 или п. 20, где пациентом является человек.

По доверенности

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ, ИЗМЕНЕННАЯ ПО СТАТЬЕ 34 РСТ

1. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с фактором комплемента C2 человека, где указанное моноклональное антитело или его фрагмент содержит:

домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

2. Моноклональное антитело по п. 1, где моноклональное антитело включает полноразмерное моноклональное антитело.

3. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2, где моноклональное антитело содержит константный домен тяжелой цепи IgG человека.

4. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, где константный домен тяжелой цепи содержит константный домен тяжелой цепи IgG1 человека.

5. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 4, где константный домен тяжелой цепи IgG1 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

6. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, где константный домен тяжелой цепи содержит константный домен тяжелой цепи IgG4 человека.

7. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, где константный домен тяжелой цепи IgG4 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

8. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, где моноклональное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

9. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, где моноклональное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с фактором комплемента C2 человека, и фармацевтически приемлемый носитель, где указанное моноклональное антитело или его фрагмент содержит:

домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

11. Фармацевтическая композиция по п. 10, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит полноразмерное моноклональное антитело.

12. Фармацевтическая композиция по п. 10 или п. 11, где моноклональное антитело содержит константный домен тяжелой цепи IgG человека.

13. Молекула нуклеиновой кислоты или множество молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9.

14. Вектор или множество векторов, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты или множество молекул нуклеиновой кислоты по п. 13.

15. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или множество молекул нуклеиновой кислоты по п. 13.

16. Клетка-хозяин, содержащая вектор или множество векторов по п. 14.

17. Клетка-хозяин по любому из пп. 14-16, где клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.

18. Способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий

культивирование популяции клеток-хозяев по любому из пп. 15-17 в условиях, подходящих для экспрессии моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и

выделение моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клеток.

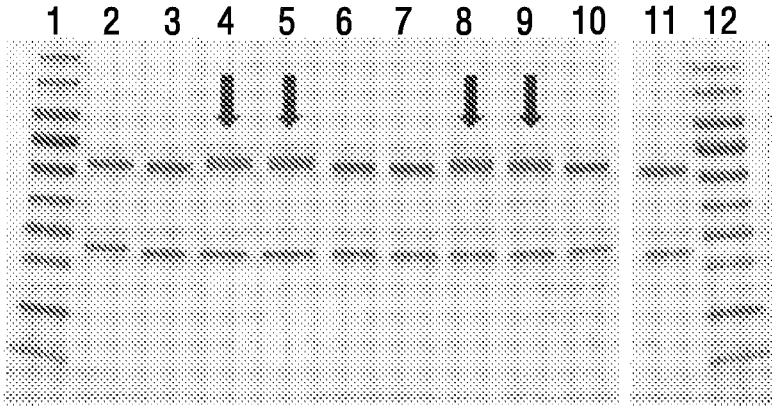
19. Способ ингибирования классического пути активации комплемента у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9.

20. Способ ингибирования лектинового пути активации комплемента у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9.

21. Способ по п. 19 или п. 20, где пациентом является человек.

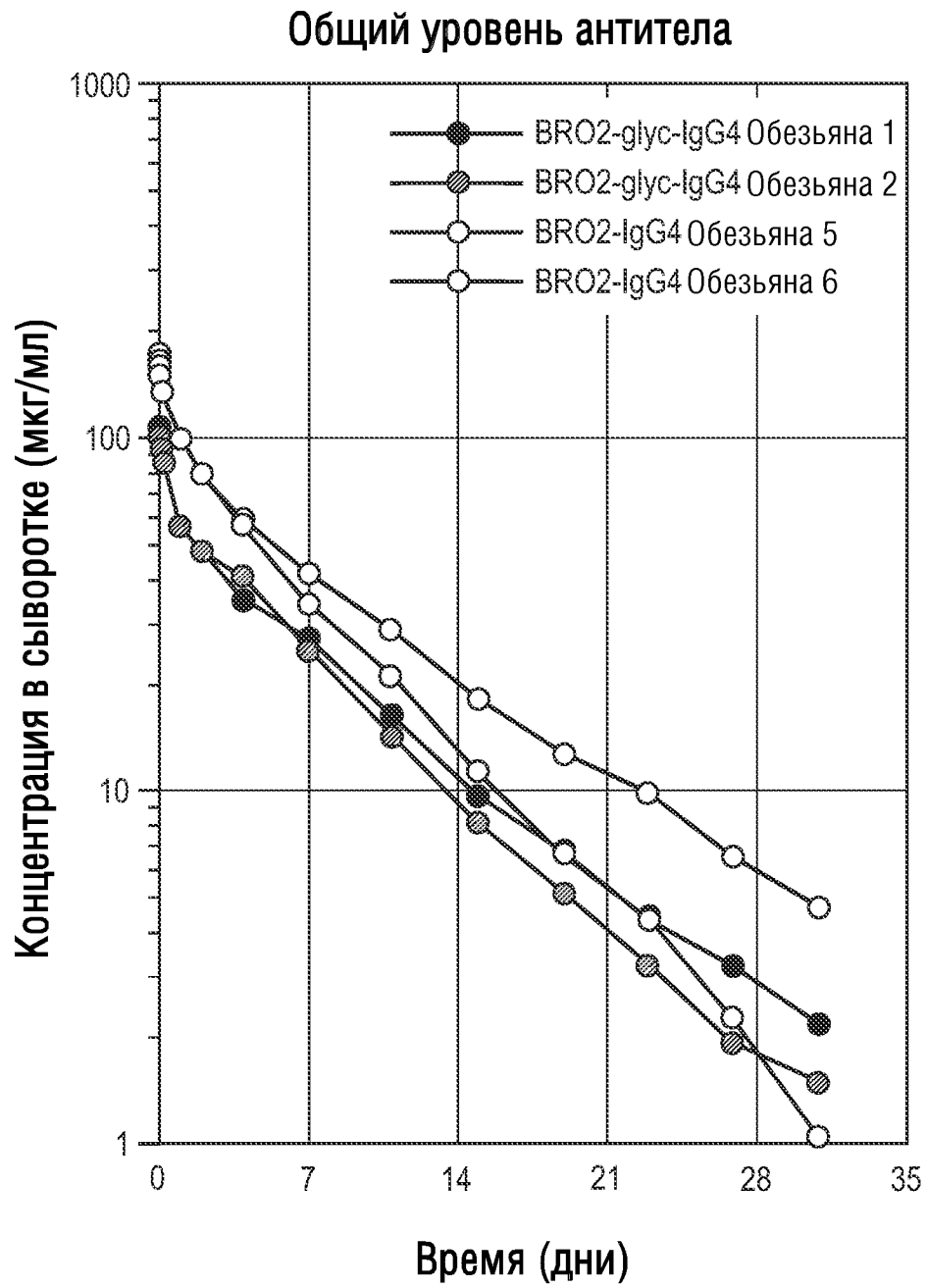
По доверенности

ФИГ.1

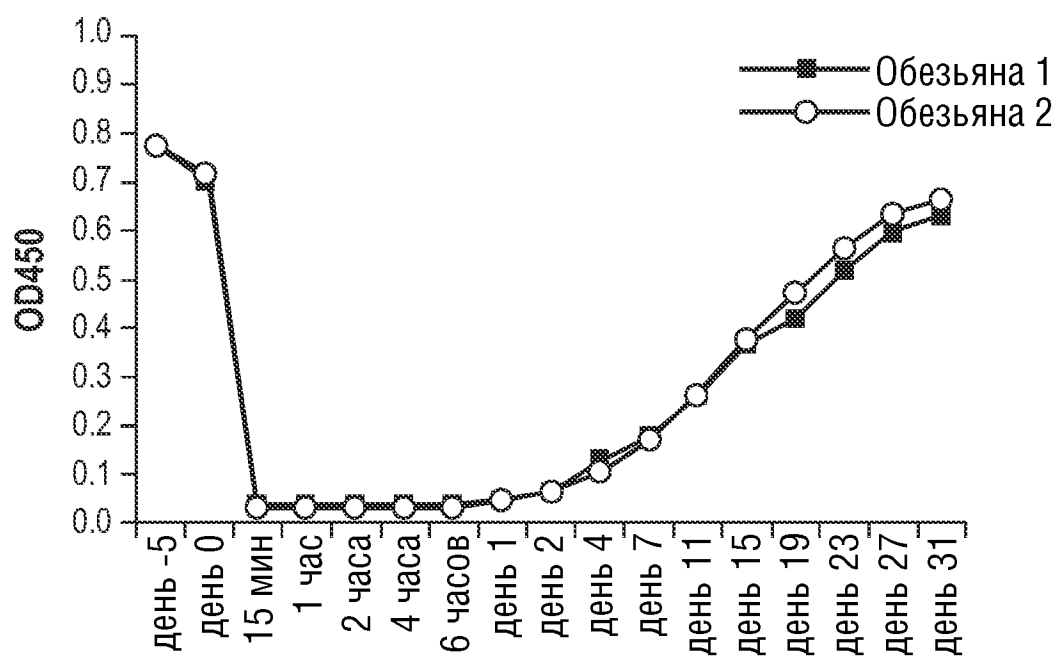


- | | | | |
|----|------------------|----|------------------|
| 1 | Белковый лэддер | 11 | VK4/VH4.2 (N72D) |
| 2 | VK wt/VH wt | 12 | Белковый лэддер |
| 3 | VK2/VH2 | | |
| 4 | VK3/VH3 | | |
| 5 | VK4/VH3 | | |
| 6 | VK3/VH3.2 (N72D) | | |
| 7 | VK4/VH3.2 (N72D) | | |
| 8 | VK3/VH4 | | |
| 9 | VK4/VH4 | | |
| 10 | VK3/VH4.2 (N72D) | | |

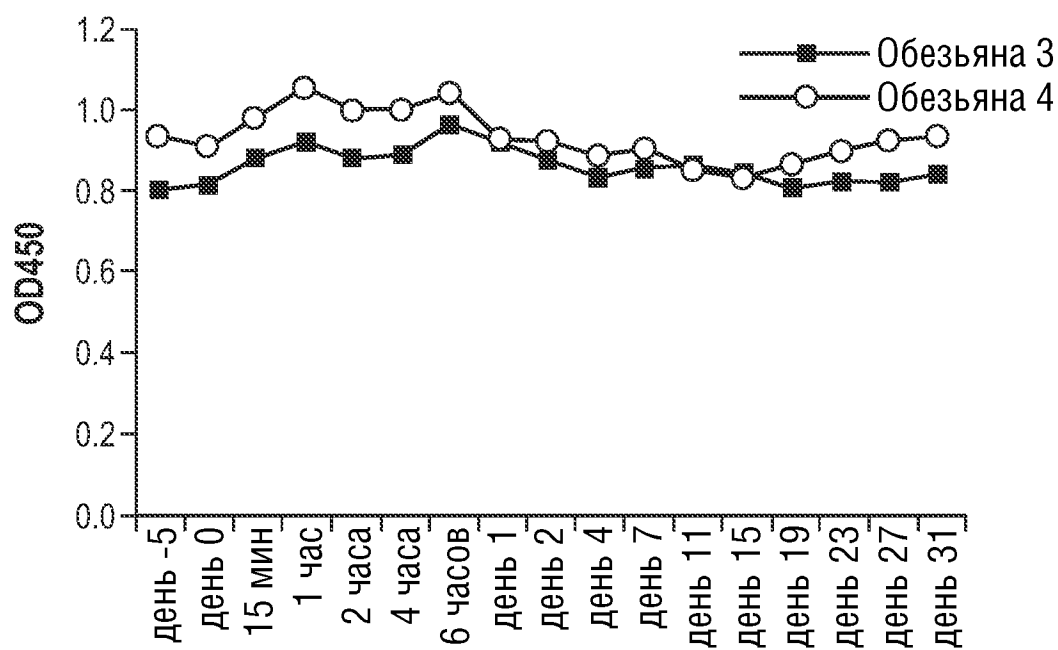
ФИГ.2



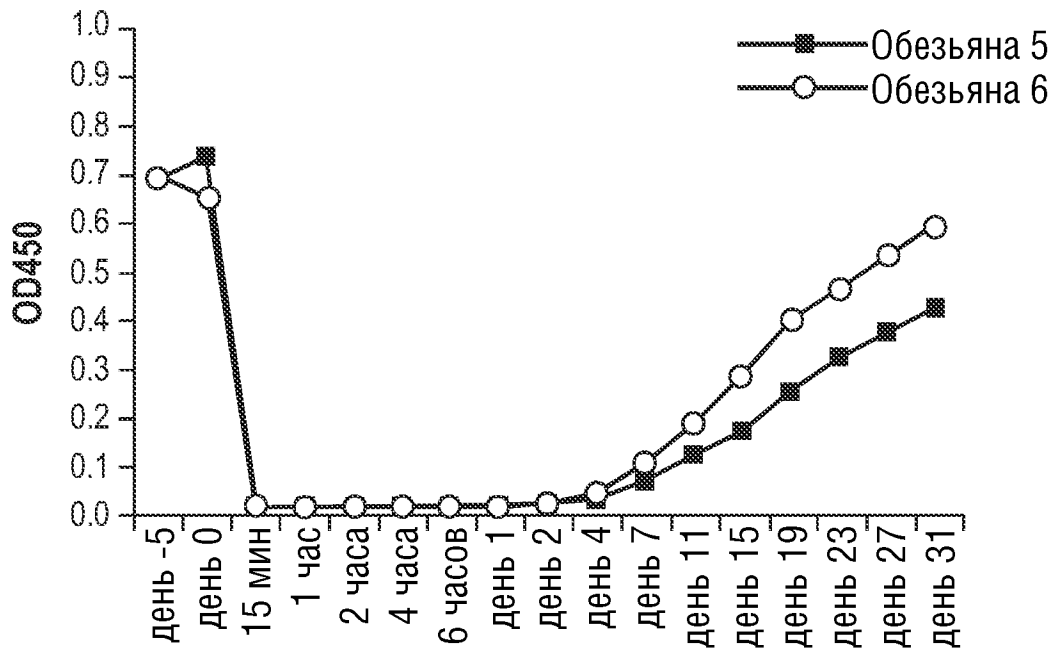
ФИГ.3А



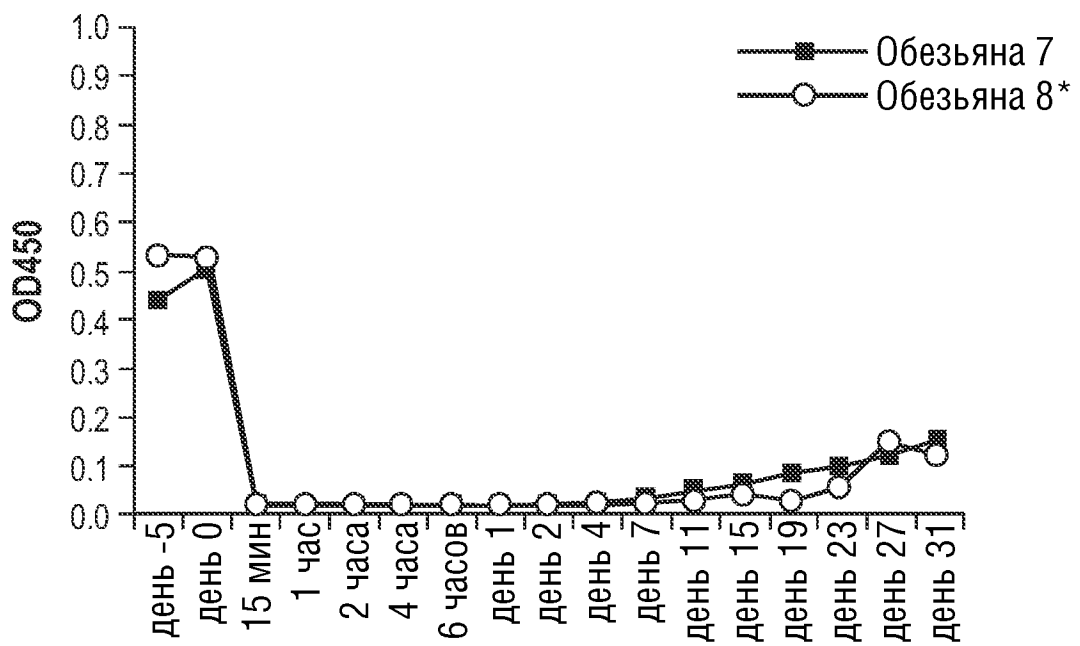
ФИГ.3В



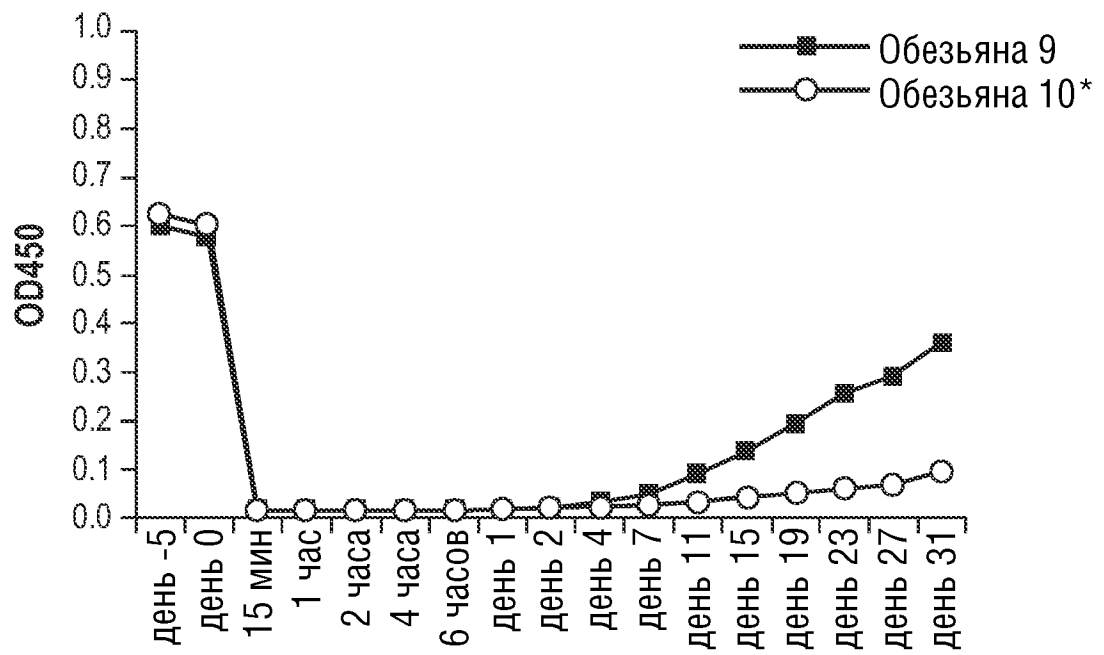
ФИГ.3С



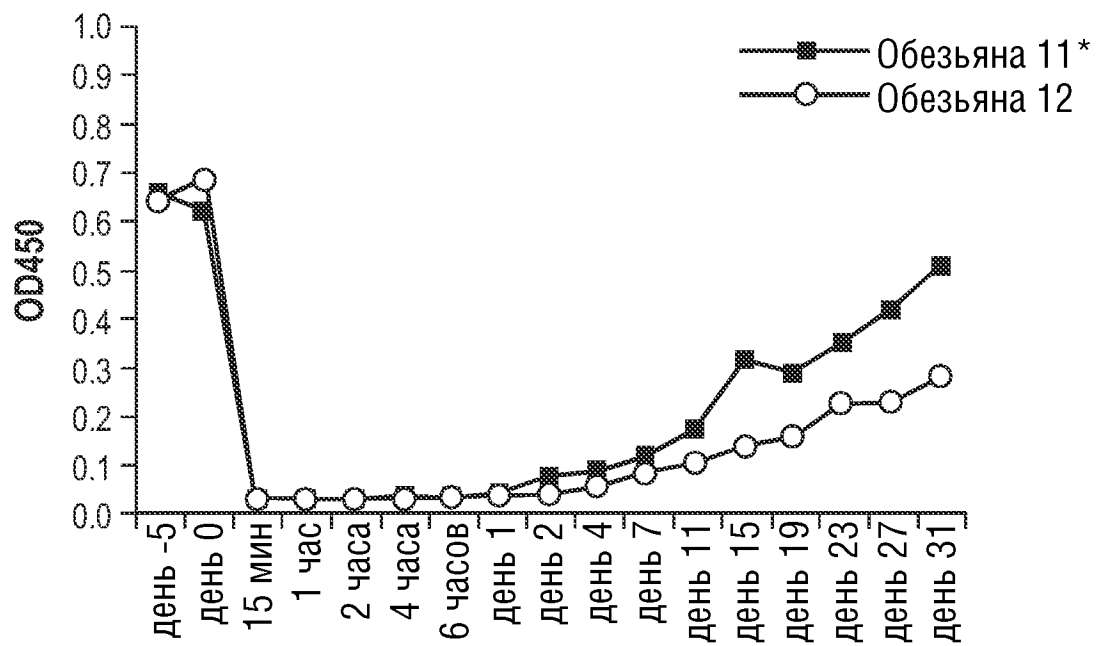
ФИГ.3D



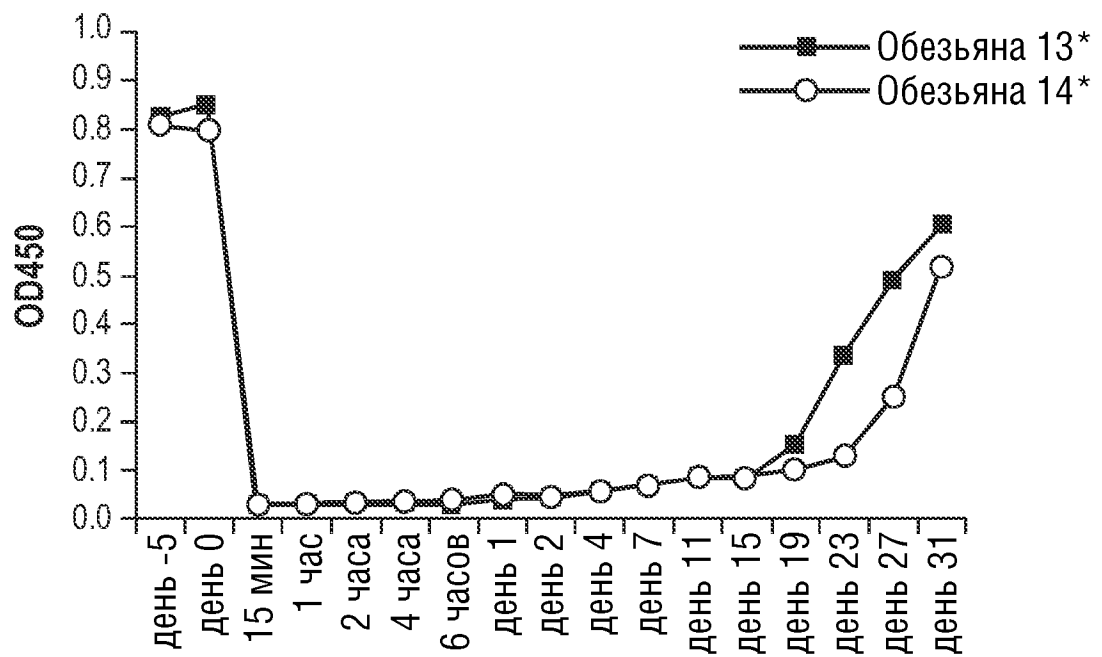
ФИГ.3Е



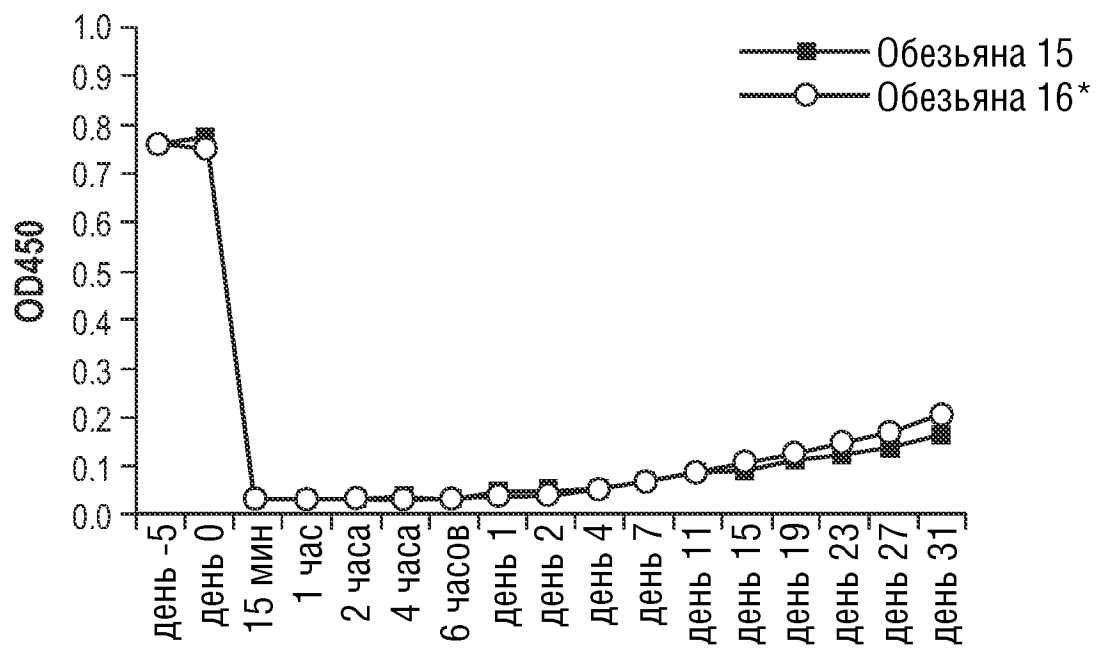
ФИГ.3F



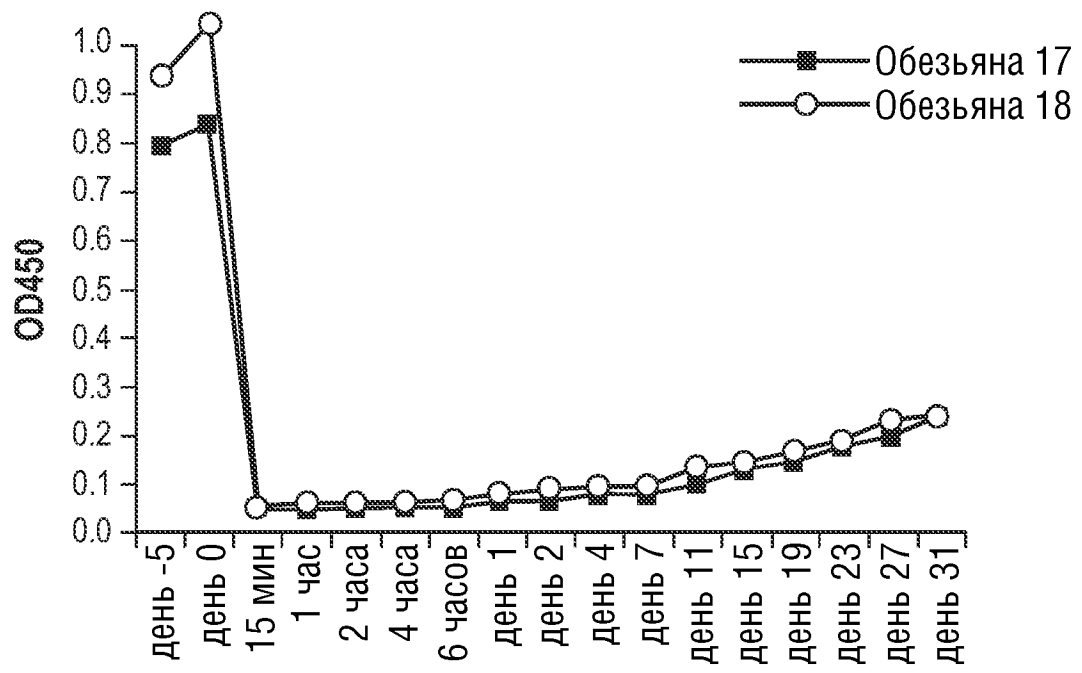
ФИГ.3Г



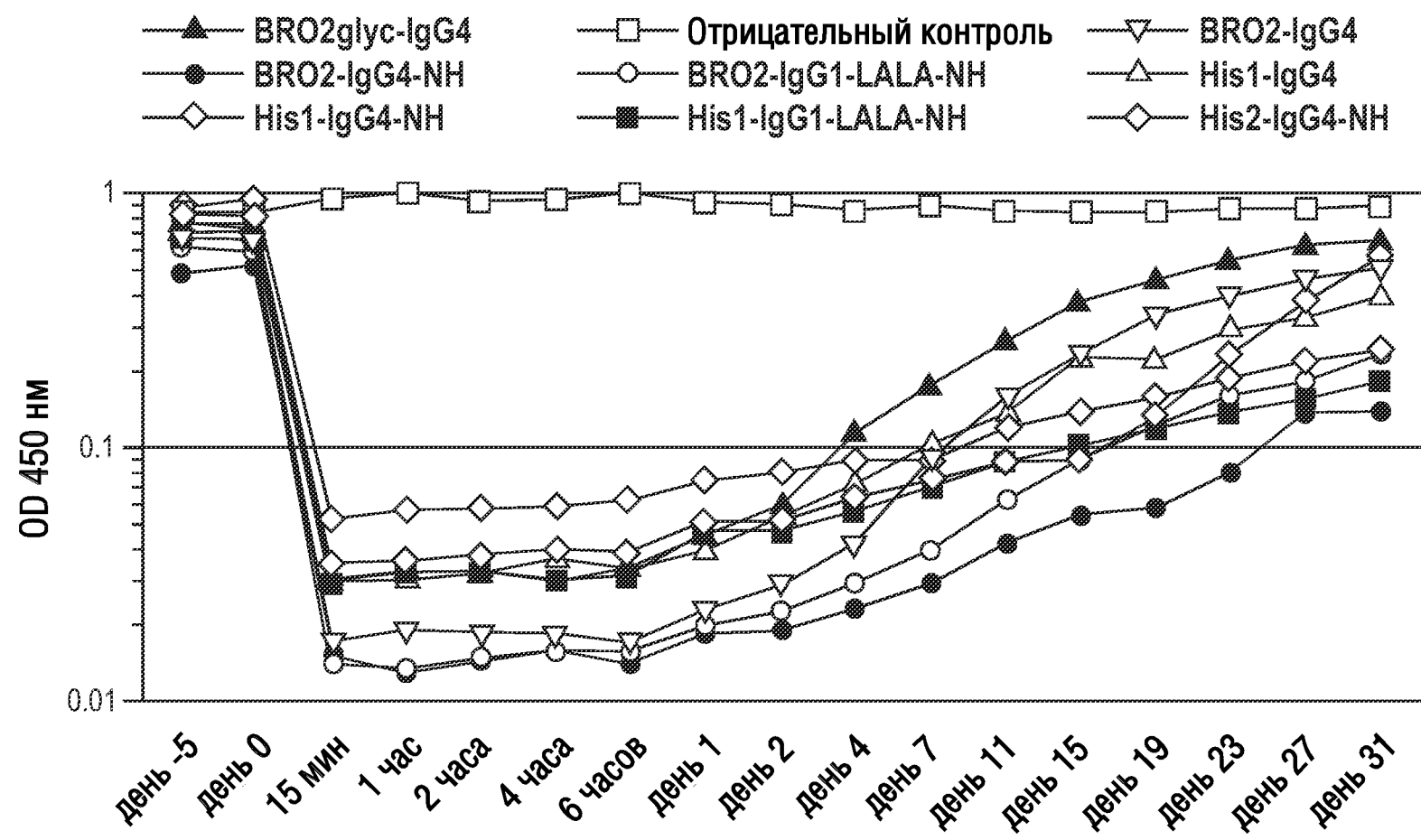
ФИГ.3Н



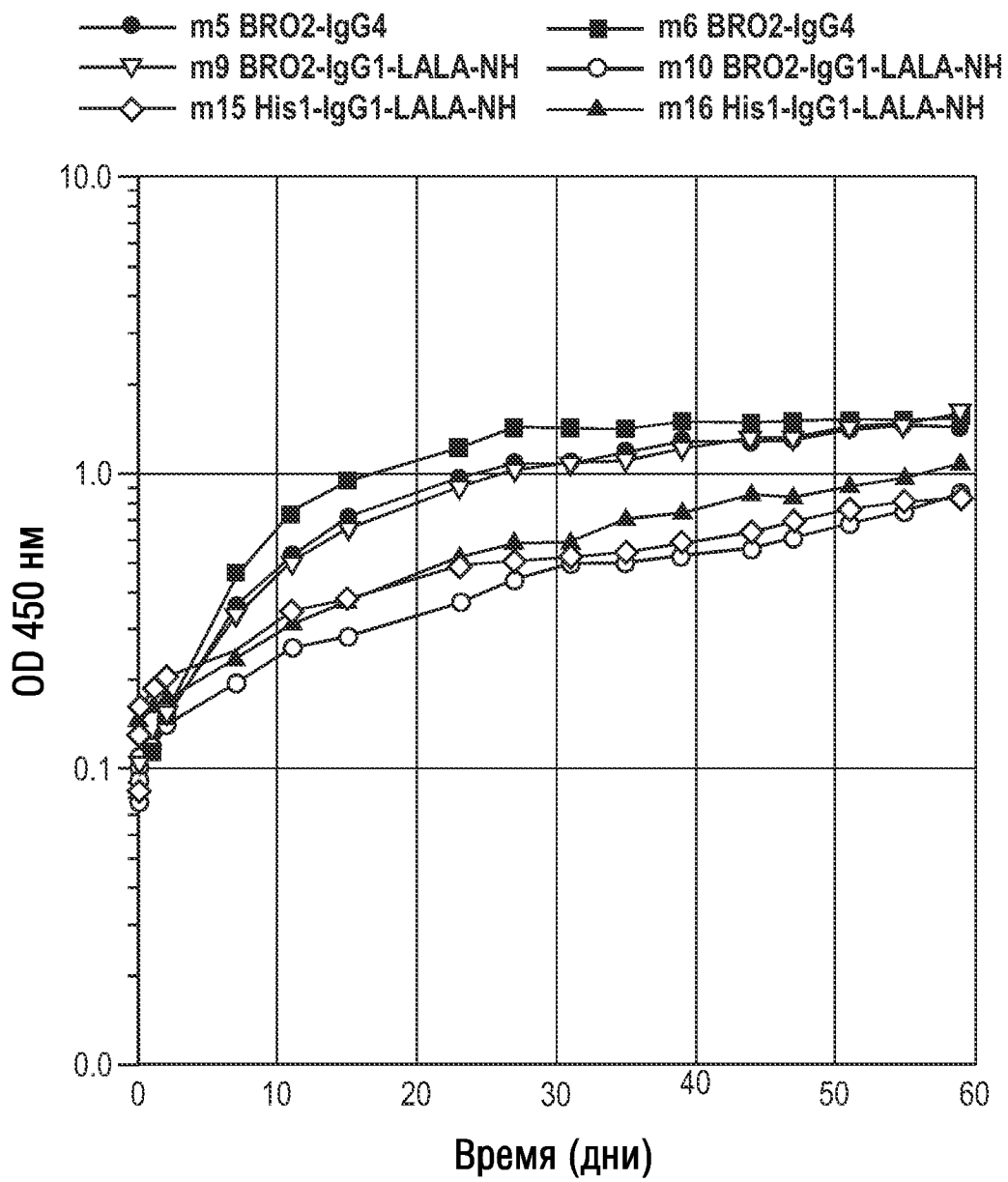
ФИГ.3I



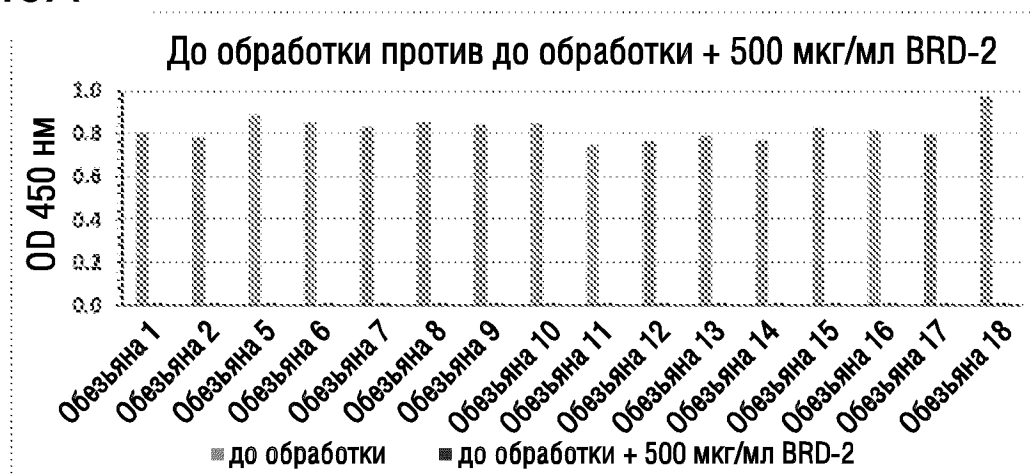
ФИГ.4



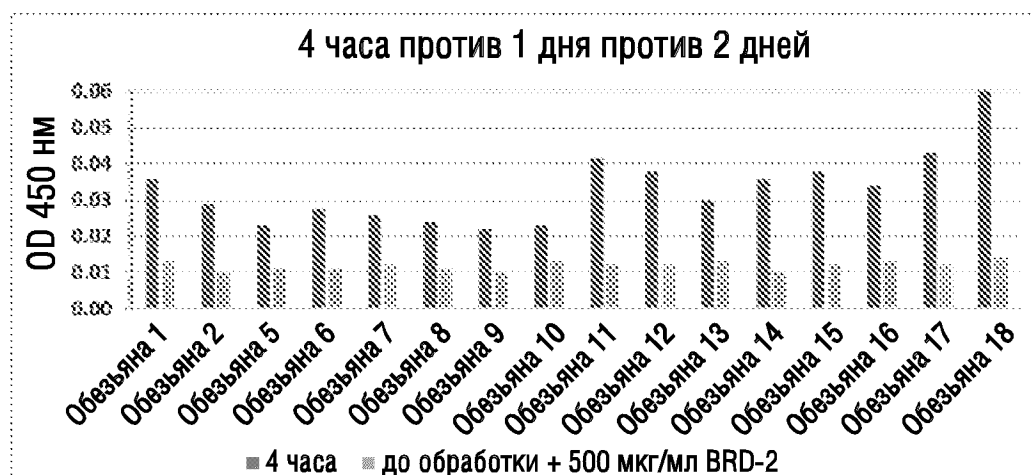
ФИГ.5



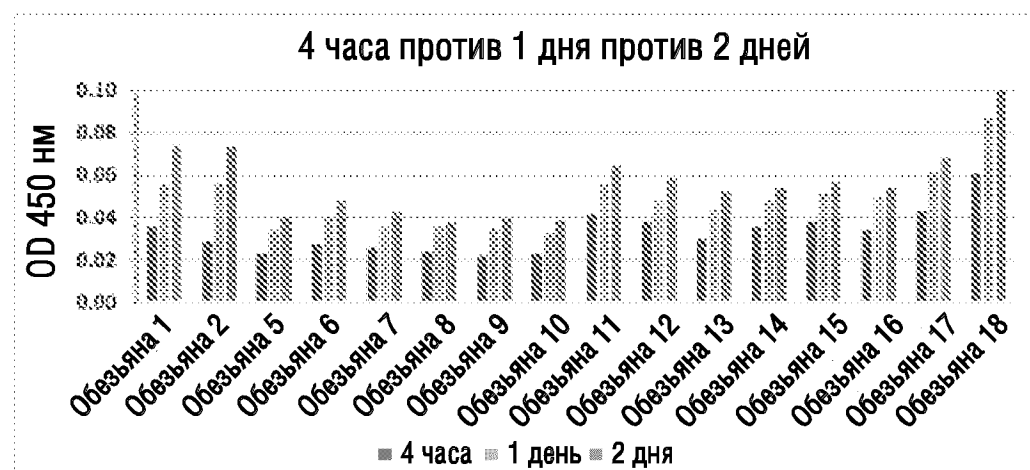
ФИГ.6А



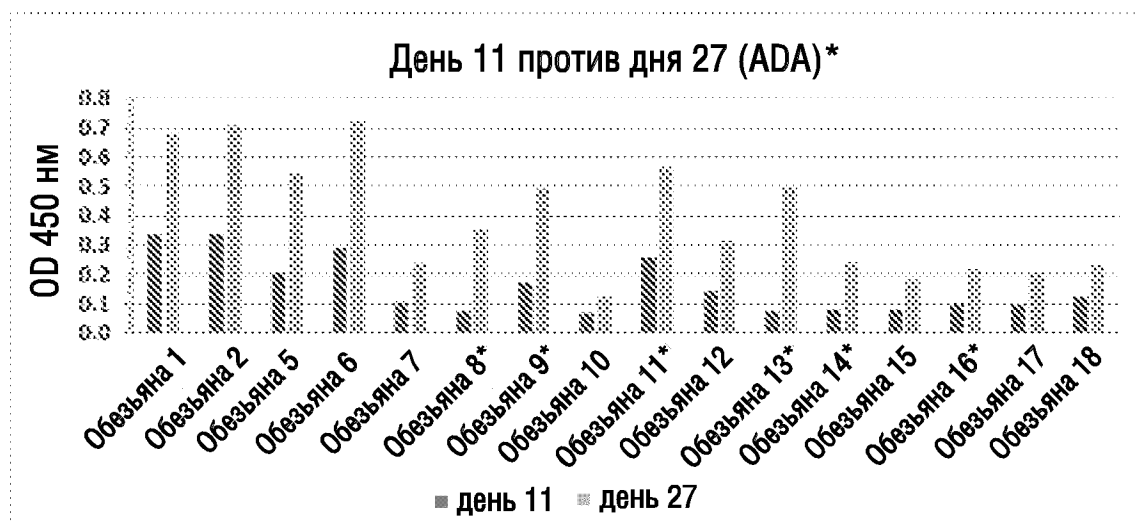
ФИГ.6В



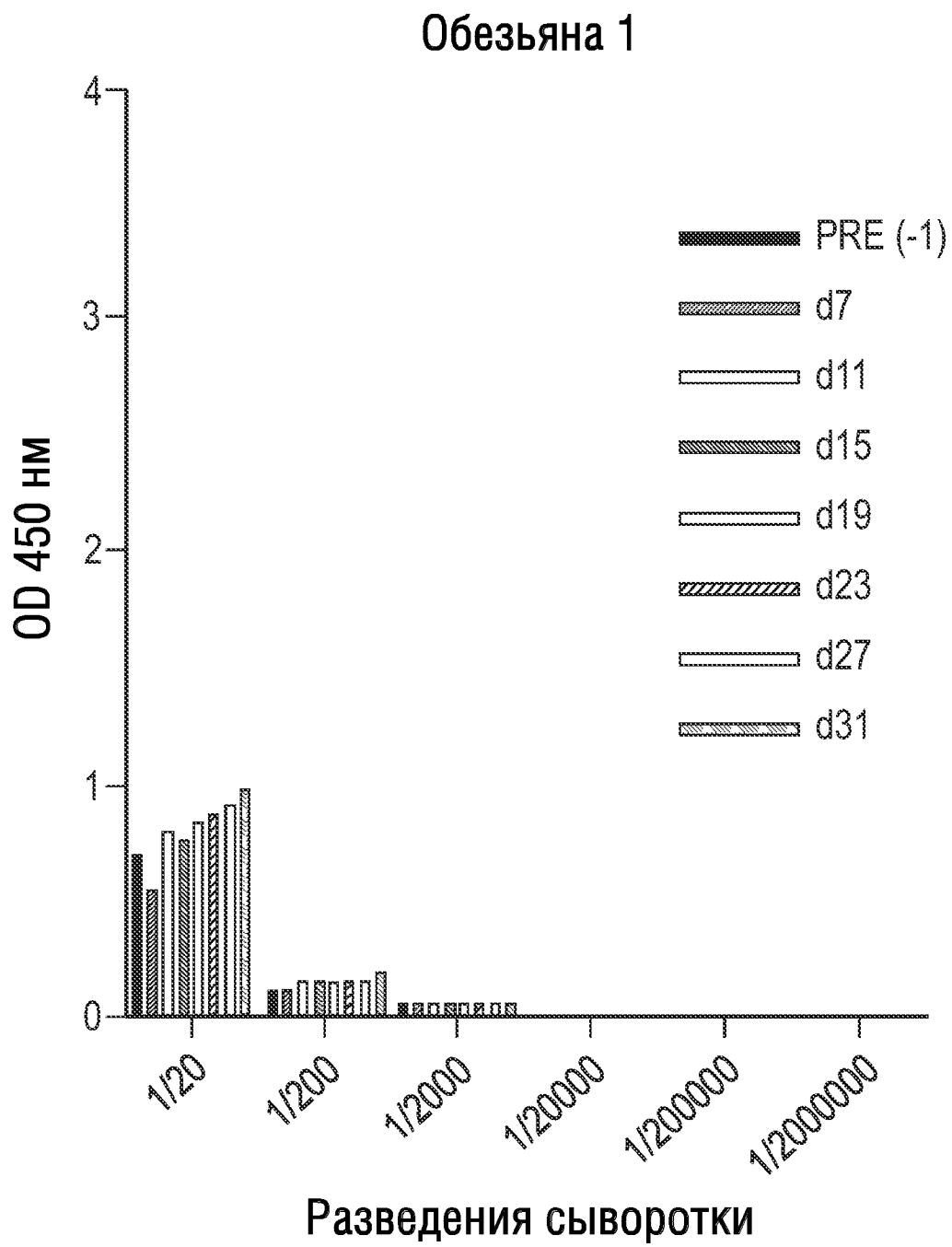
ФИГ.6С



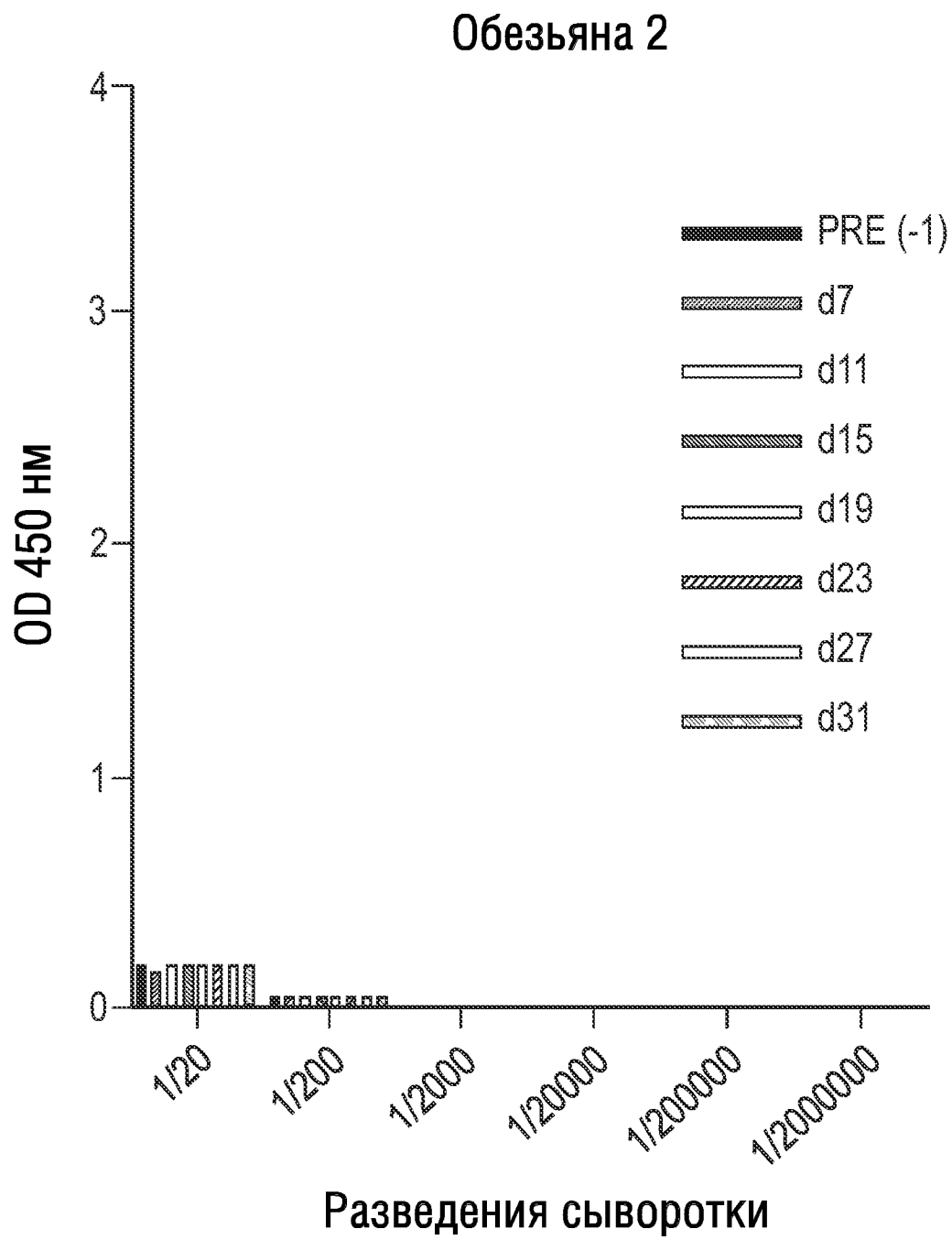
ФИГ.6D



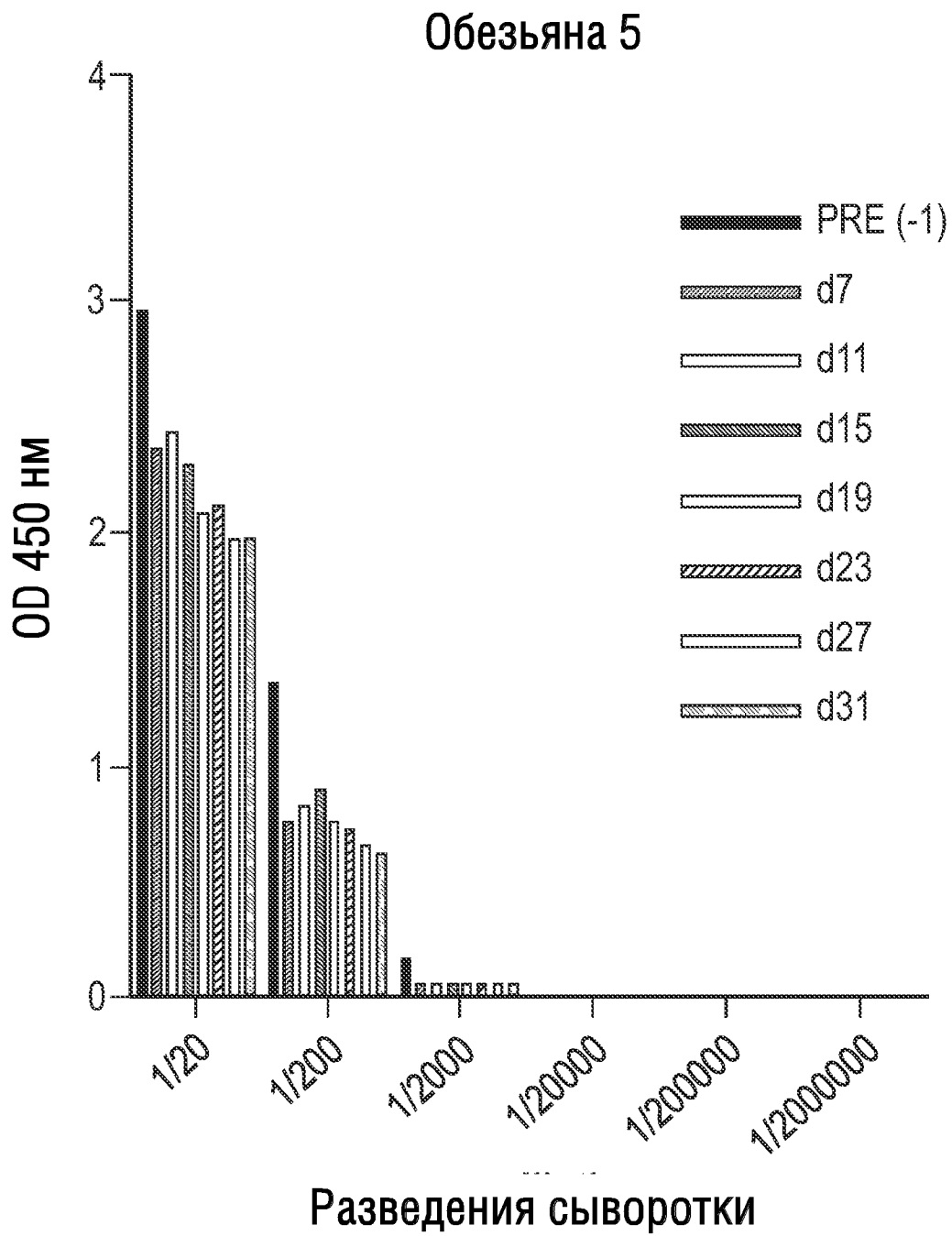
ФИГ.7А



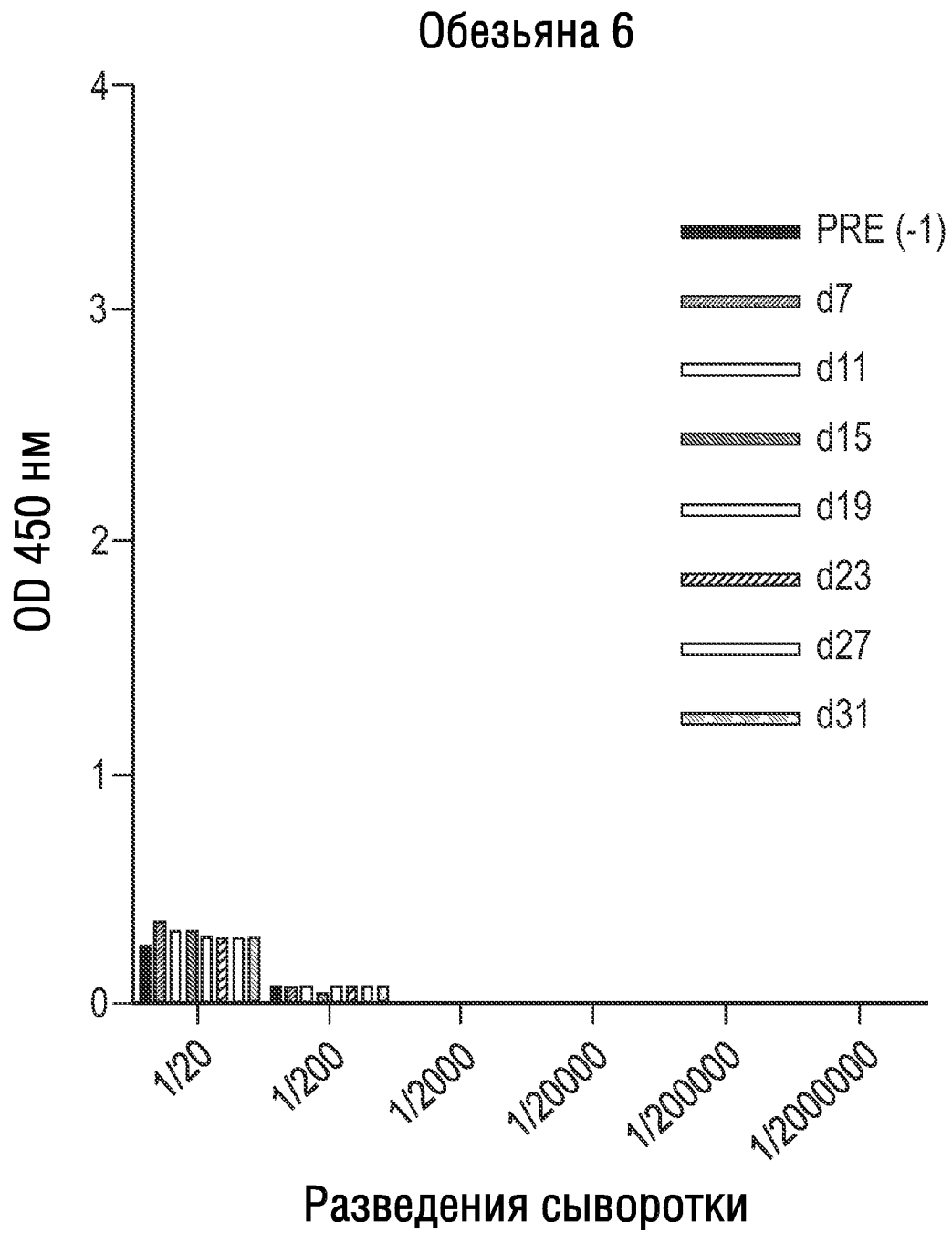
ФИГ.7В



ФИГ.7С

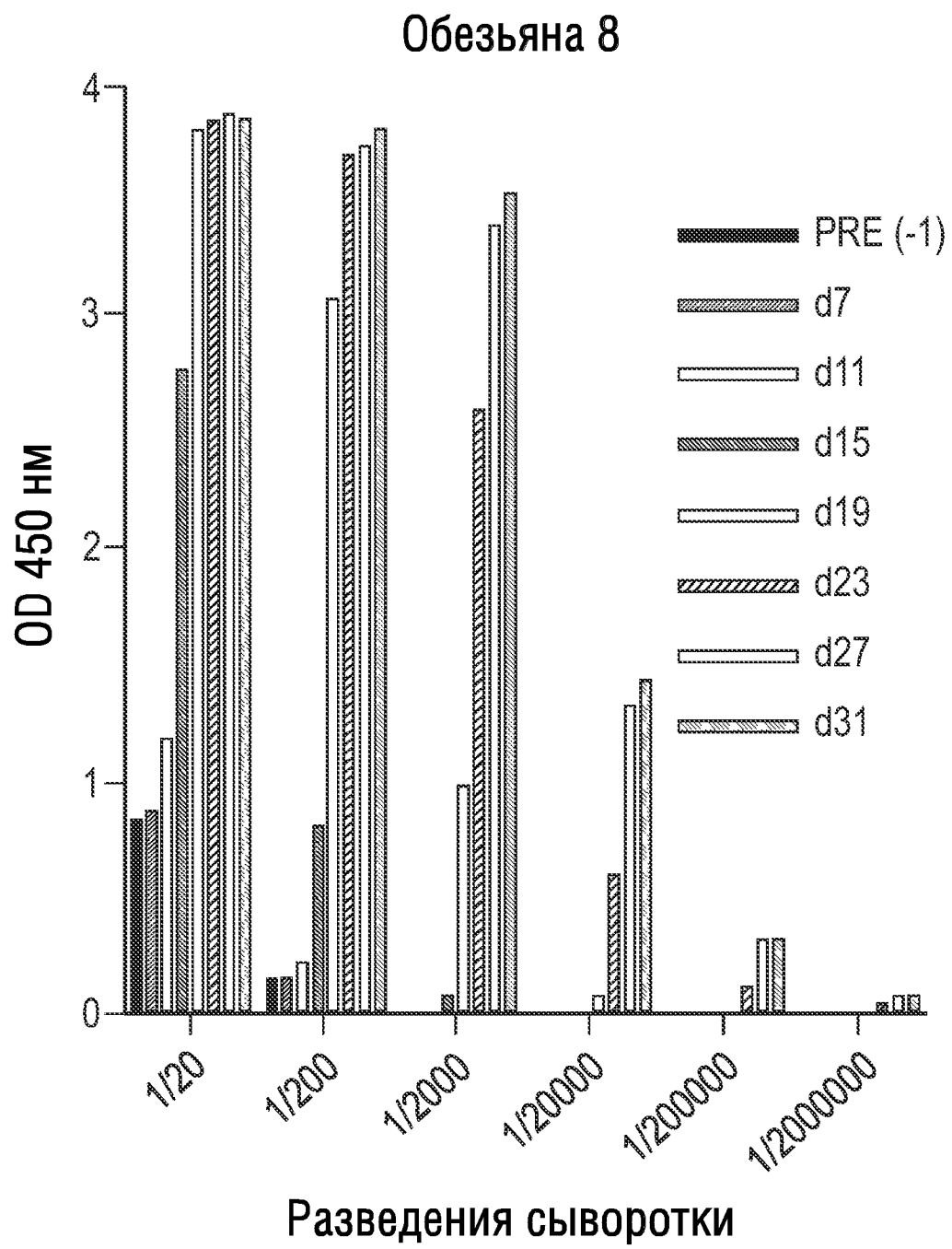


ΦΙΓ.7D

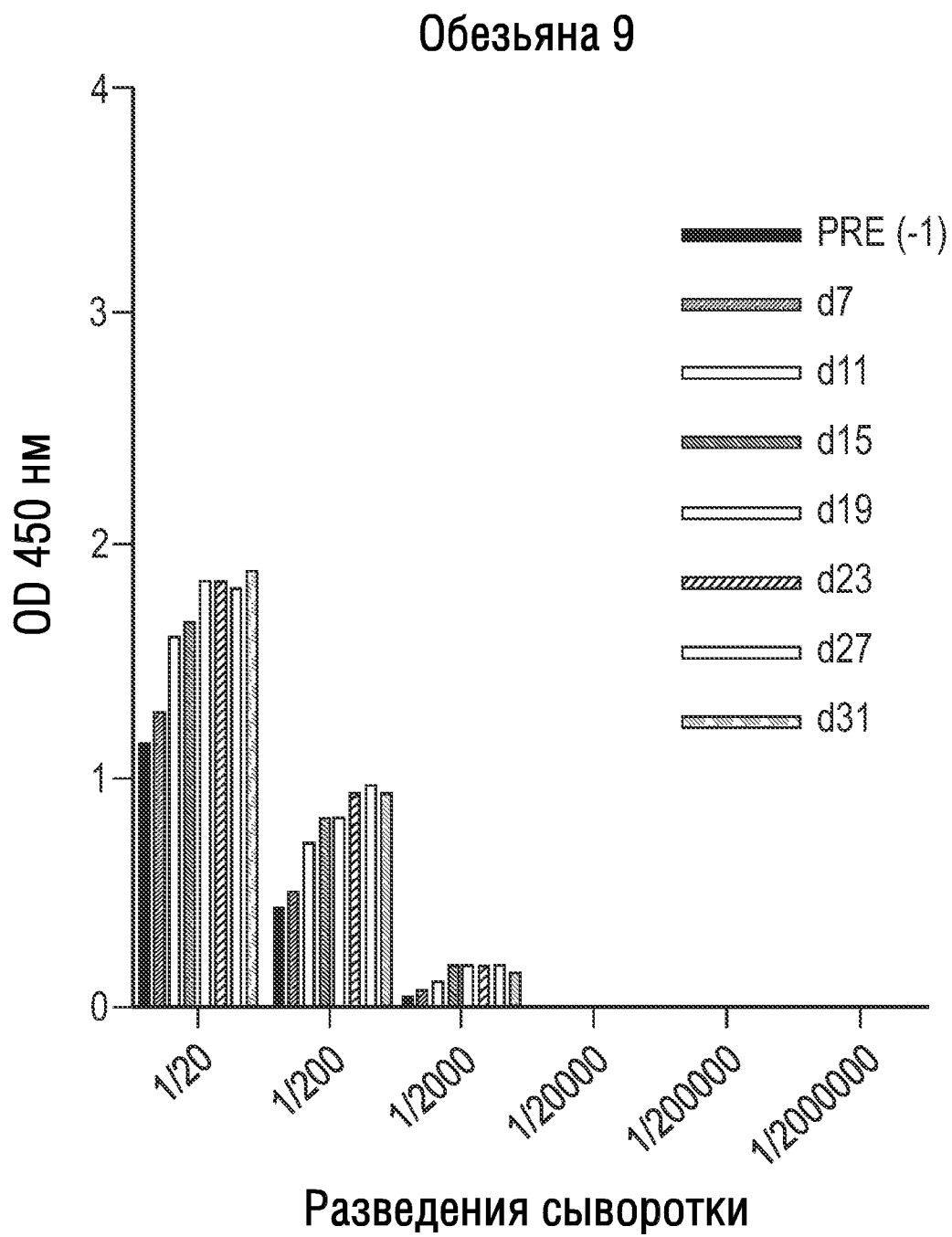




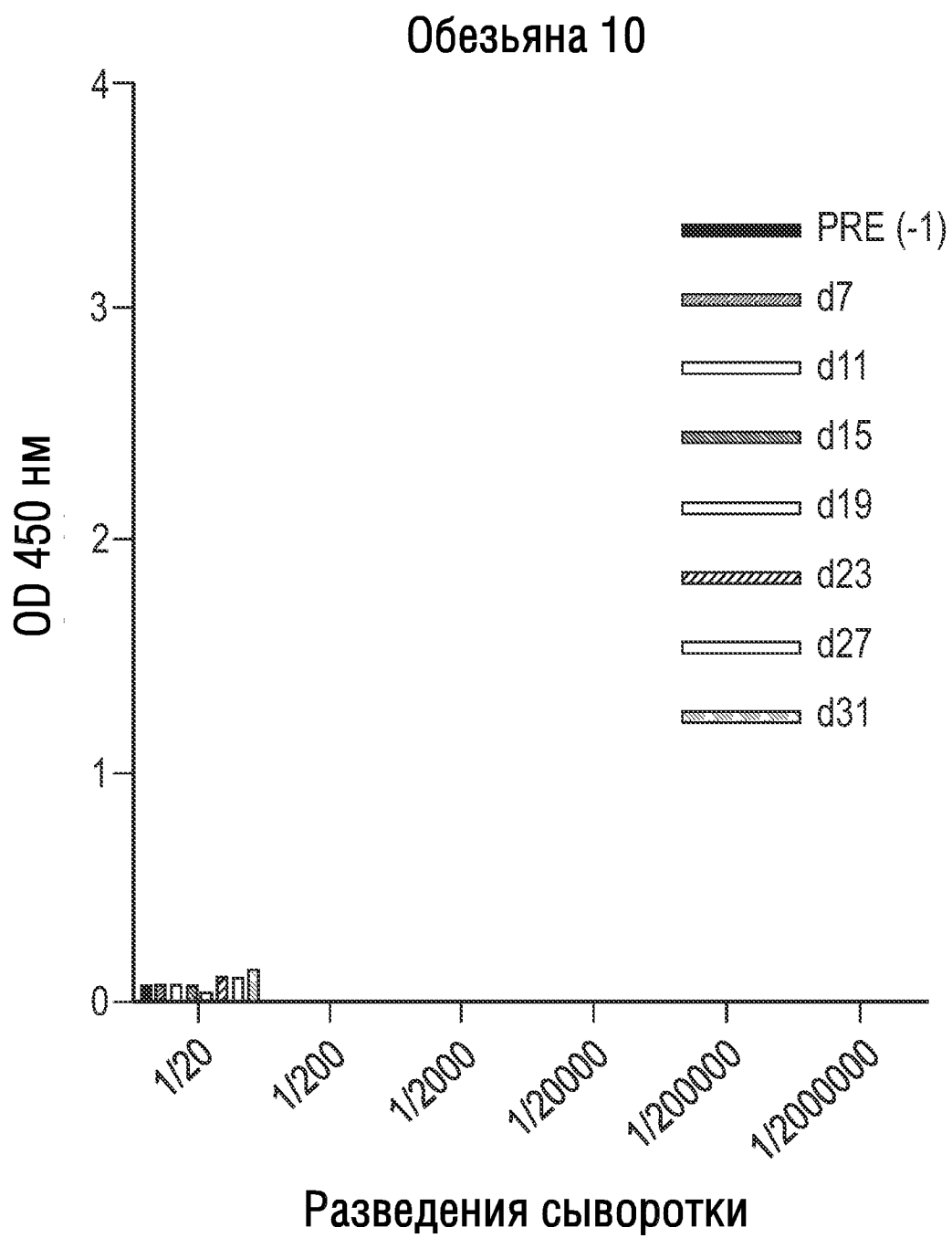
ФИГ.7F



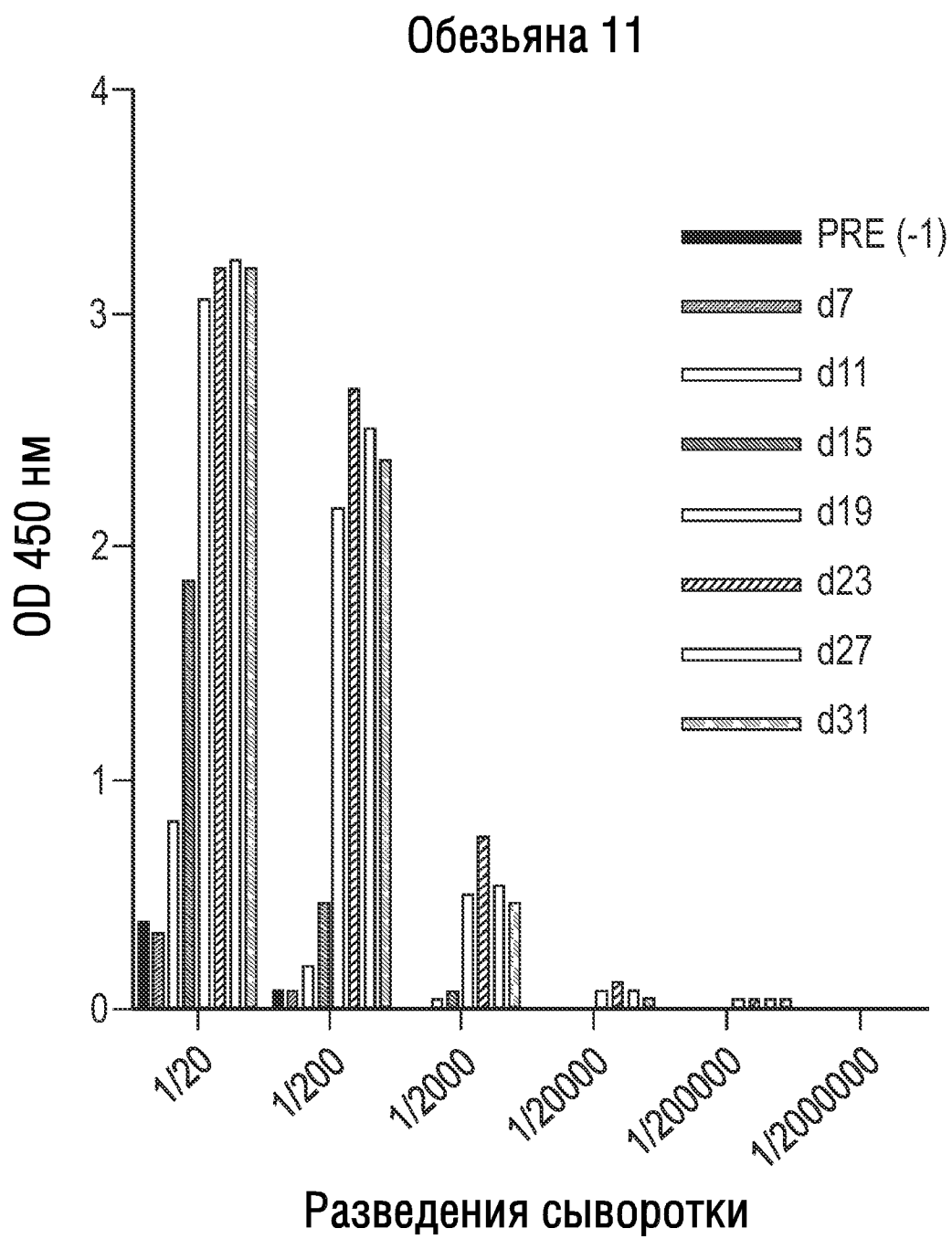
ФИГ.7G



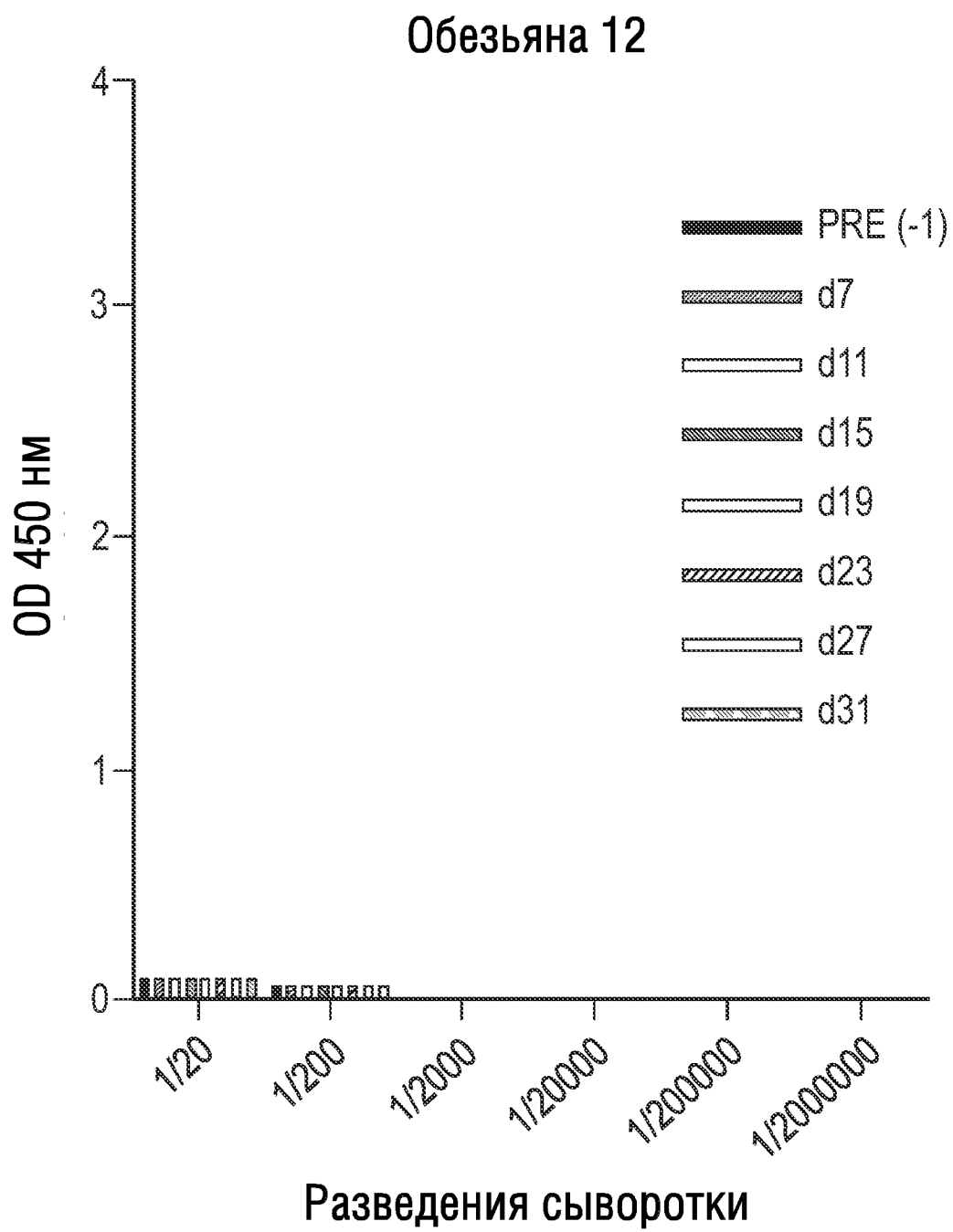
ФИГ.7Н



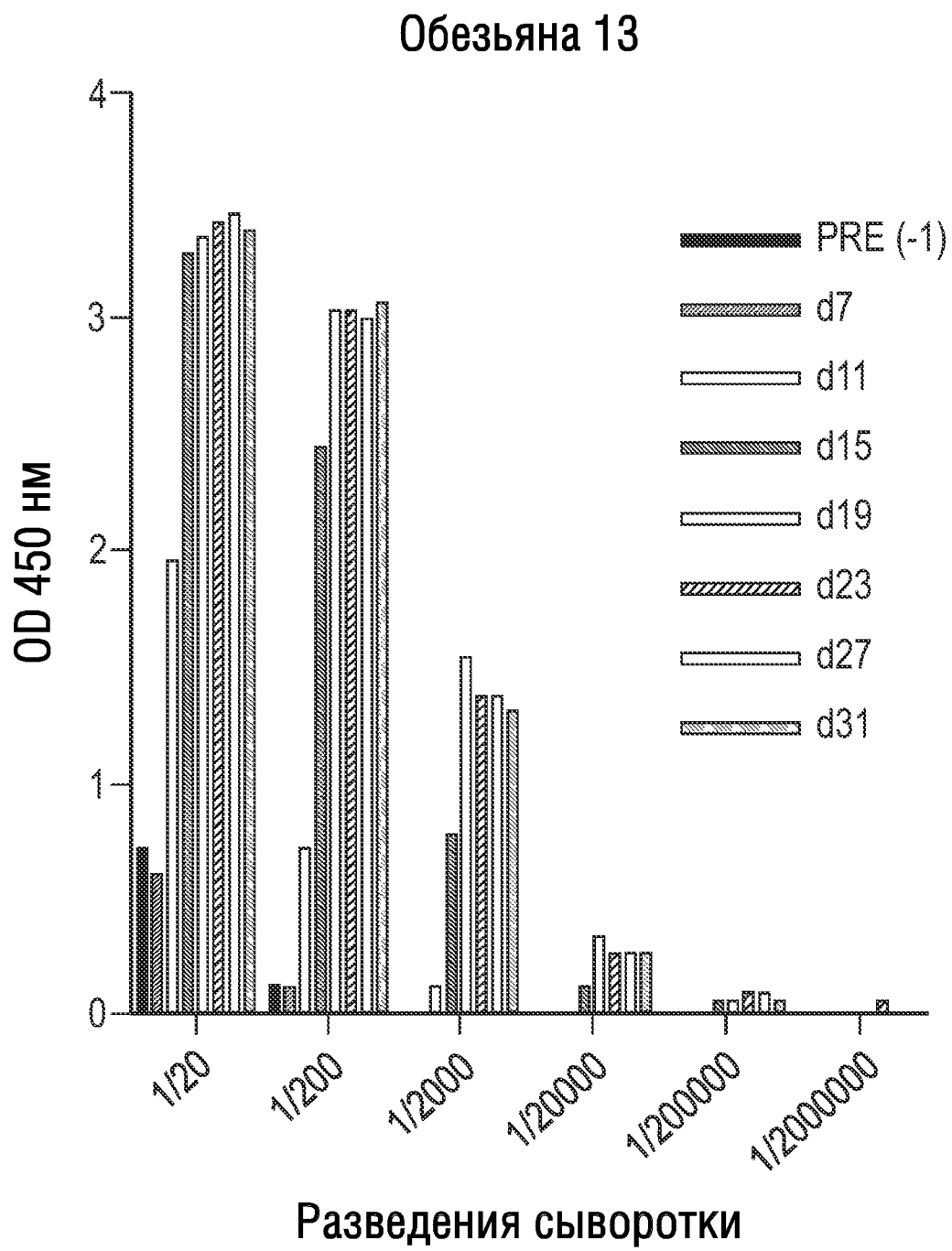
ФИГ.71



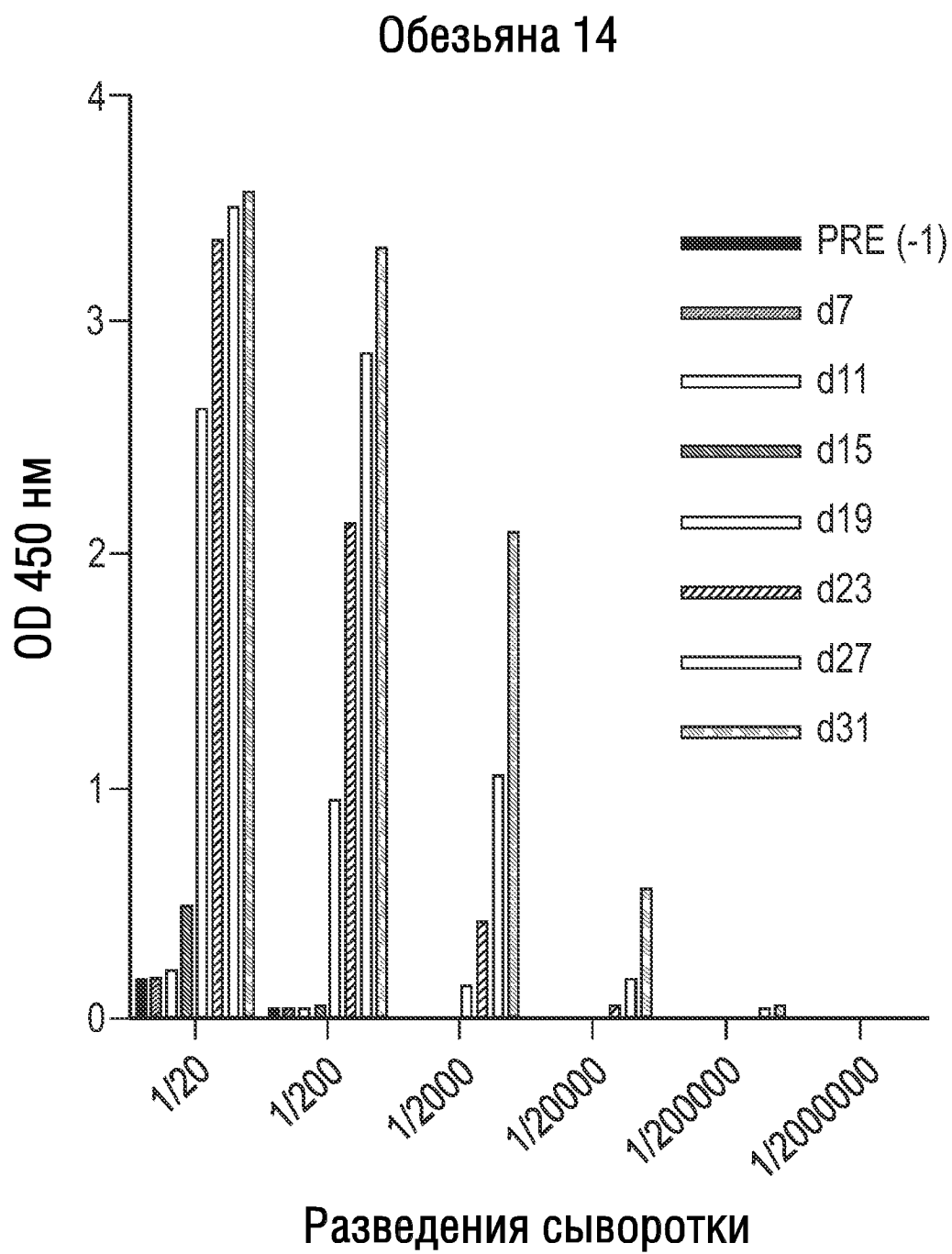
ФИГ.7J



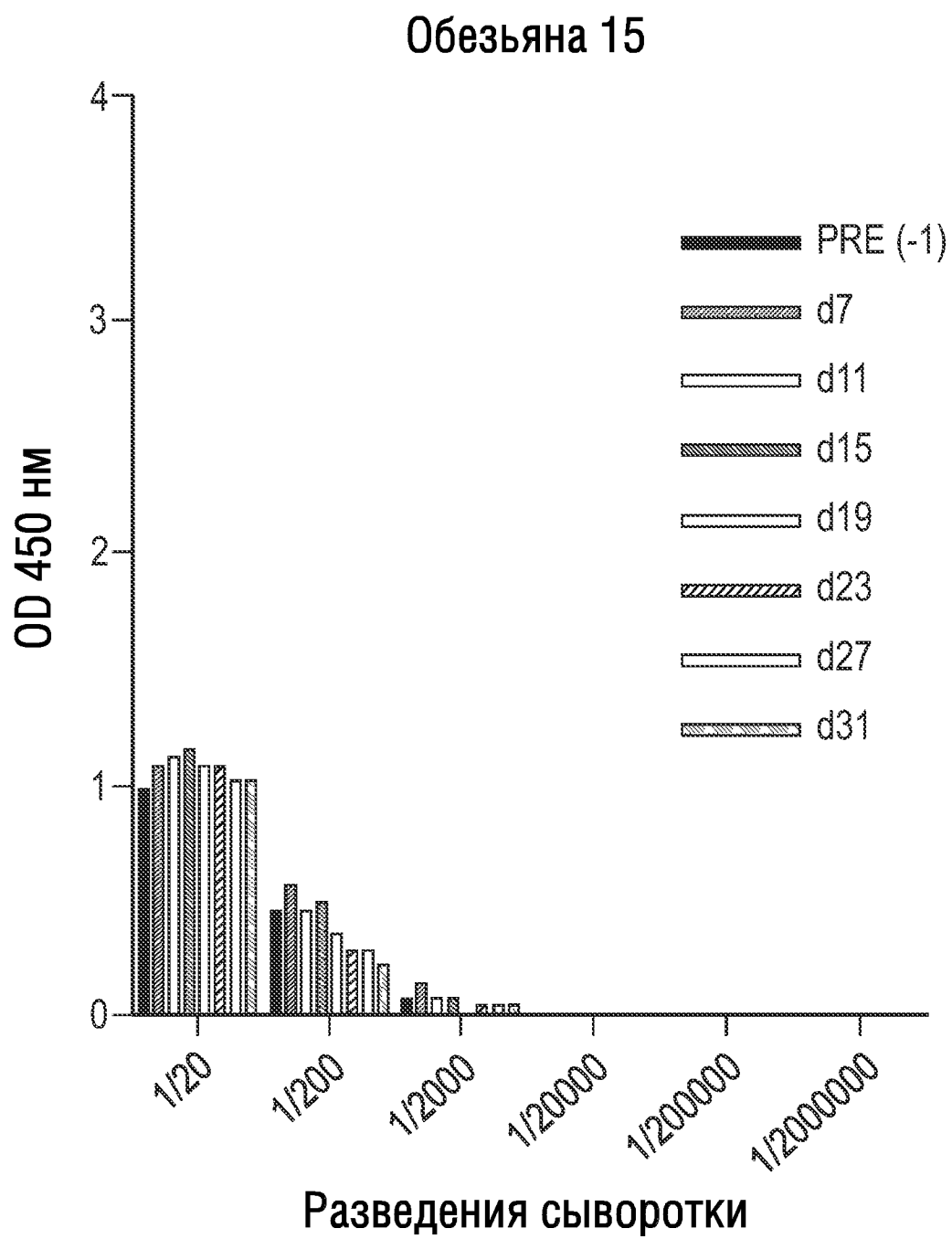
ФИГ.7К



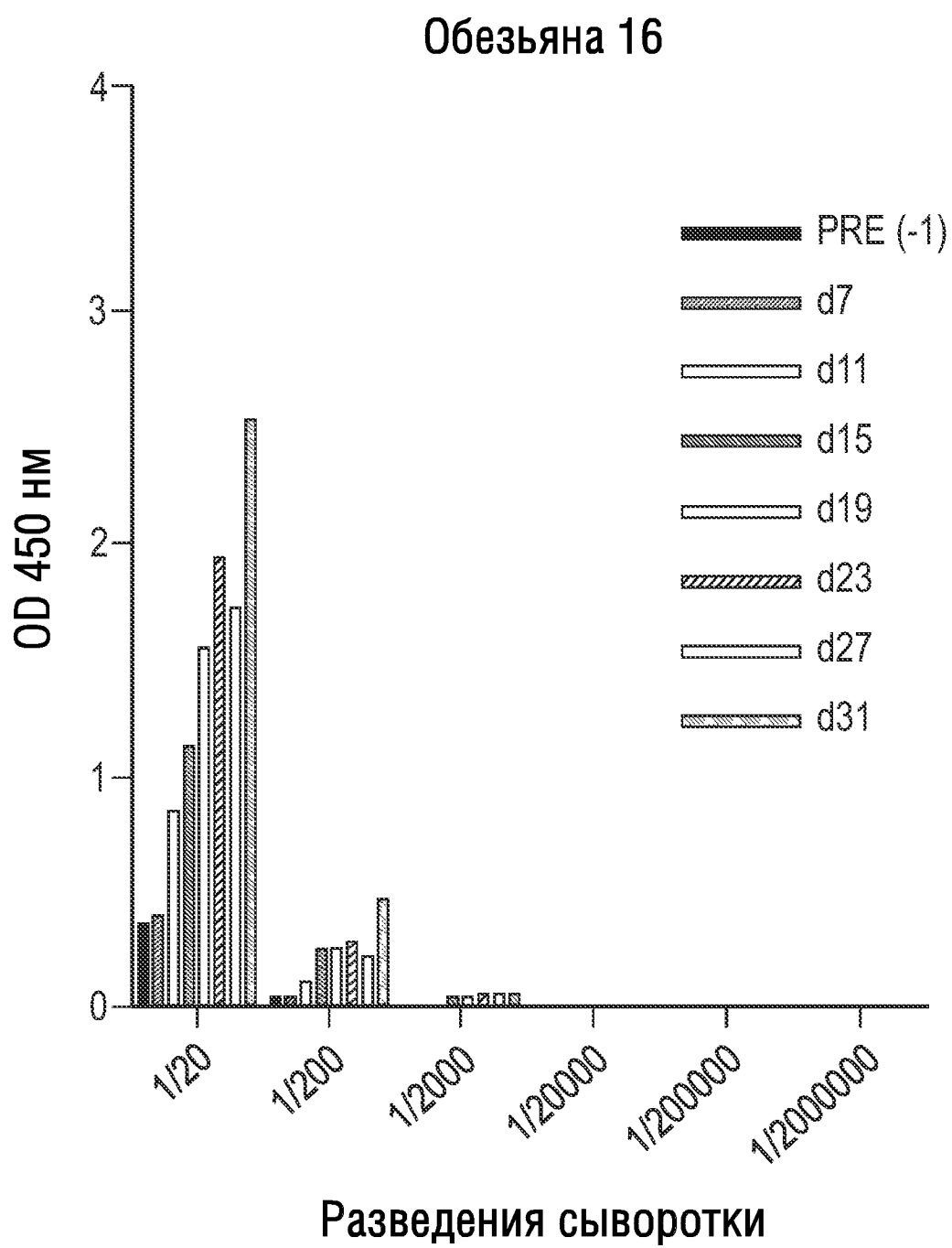
ФИГ.7L



ФИГ.7М

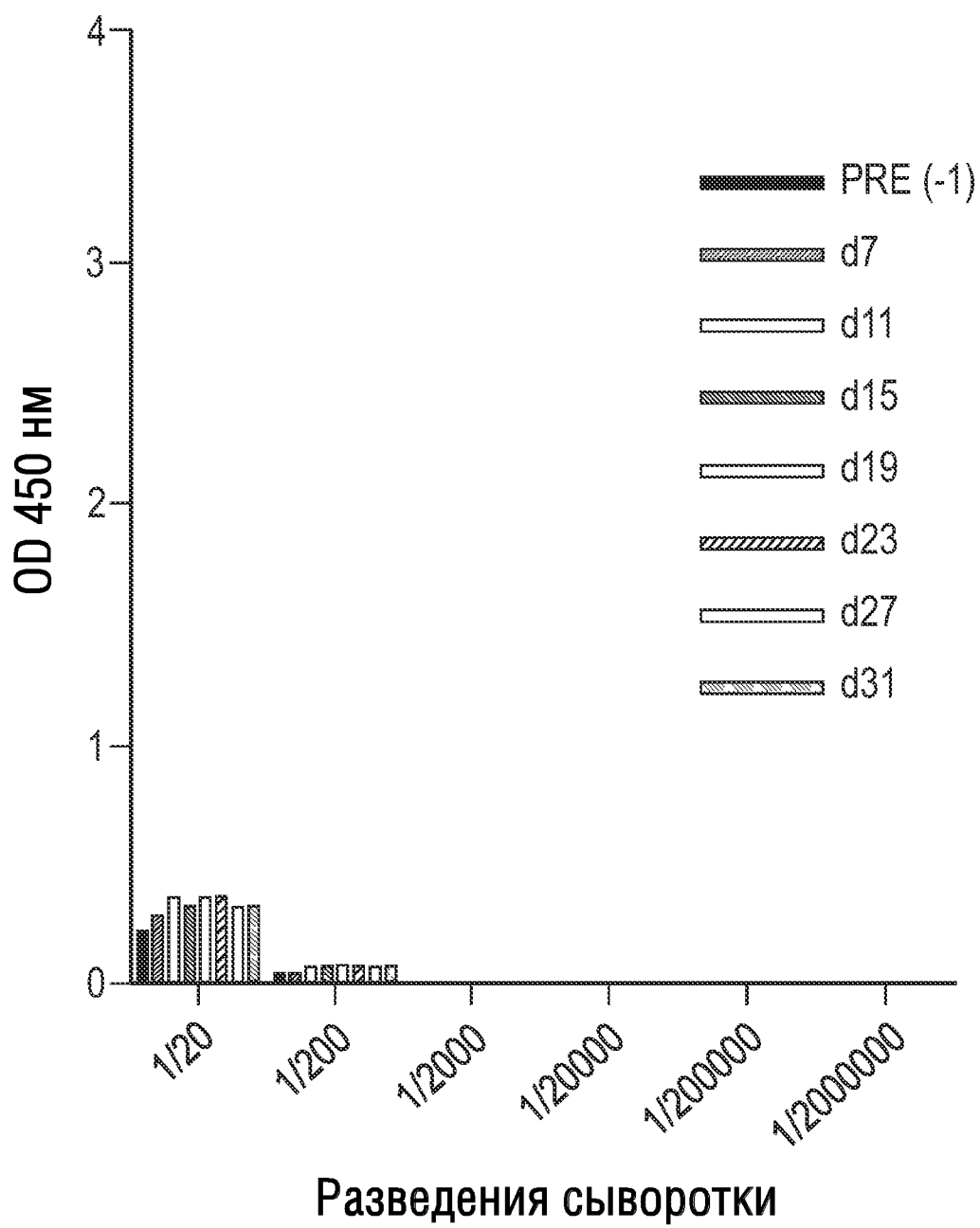


ФИГ.7N

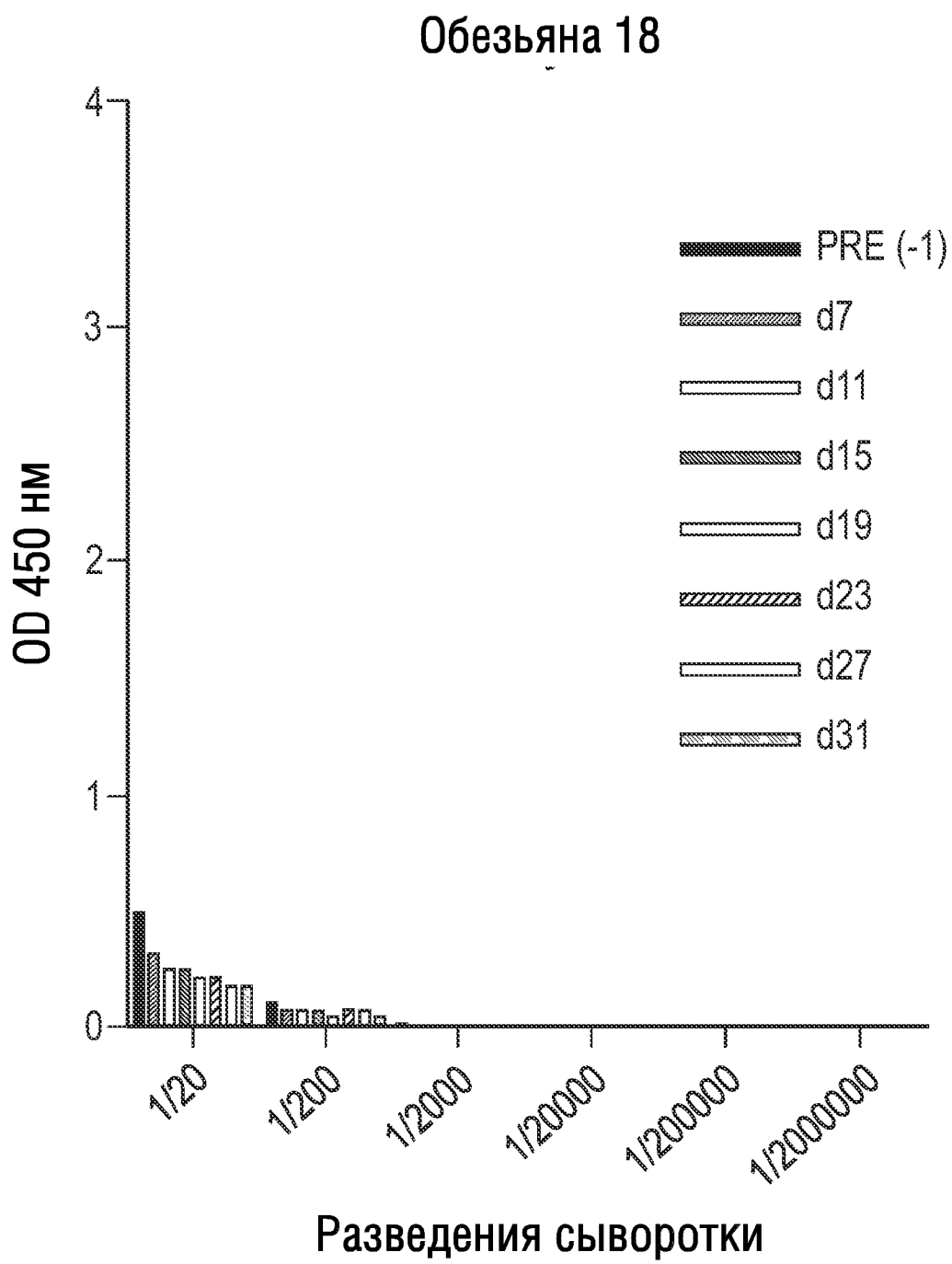


ФИГ.70

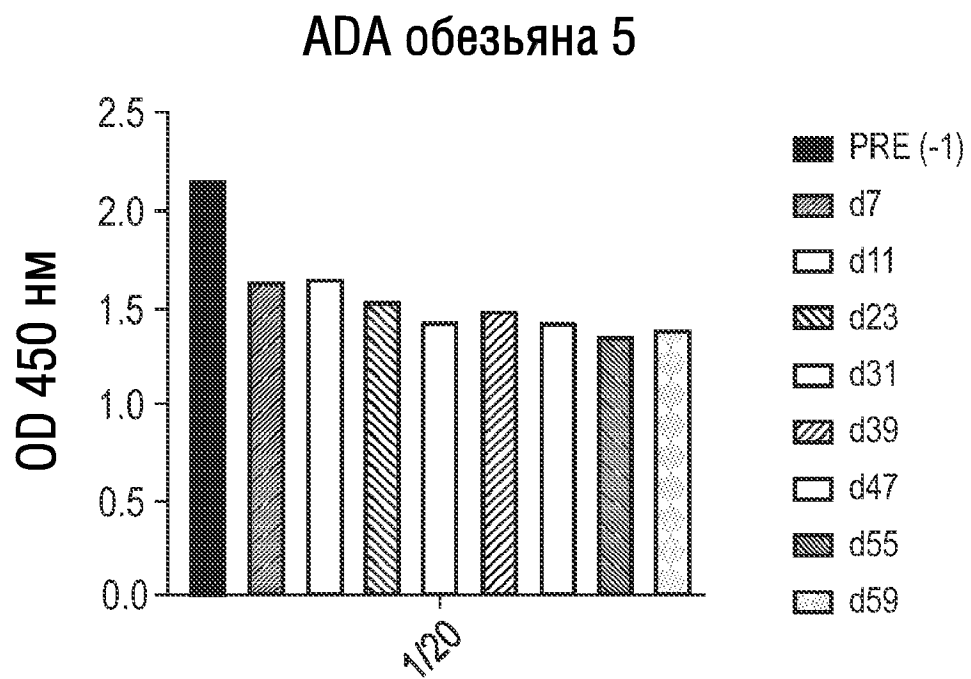
Обезьяна 17



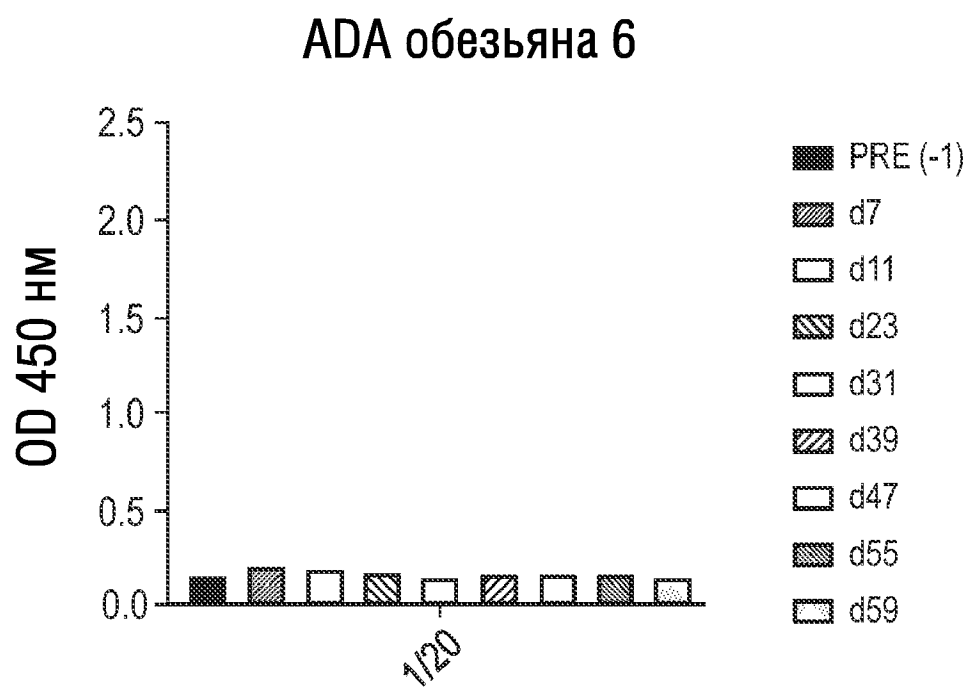
ФИГ.7Р



ФИГ.8А

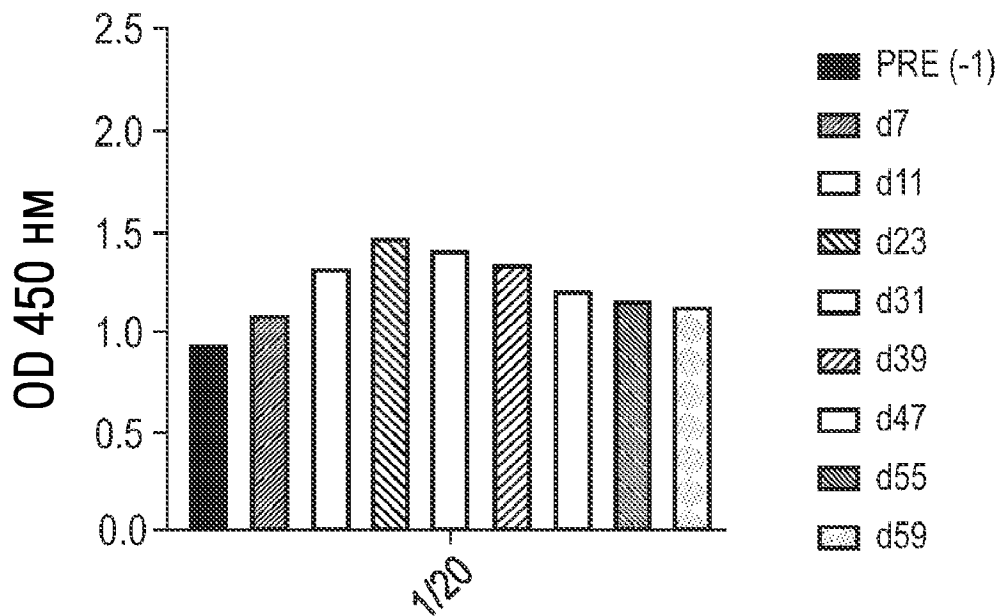


ФИГ.8В



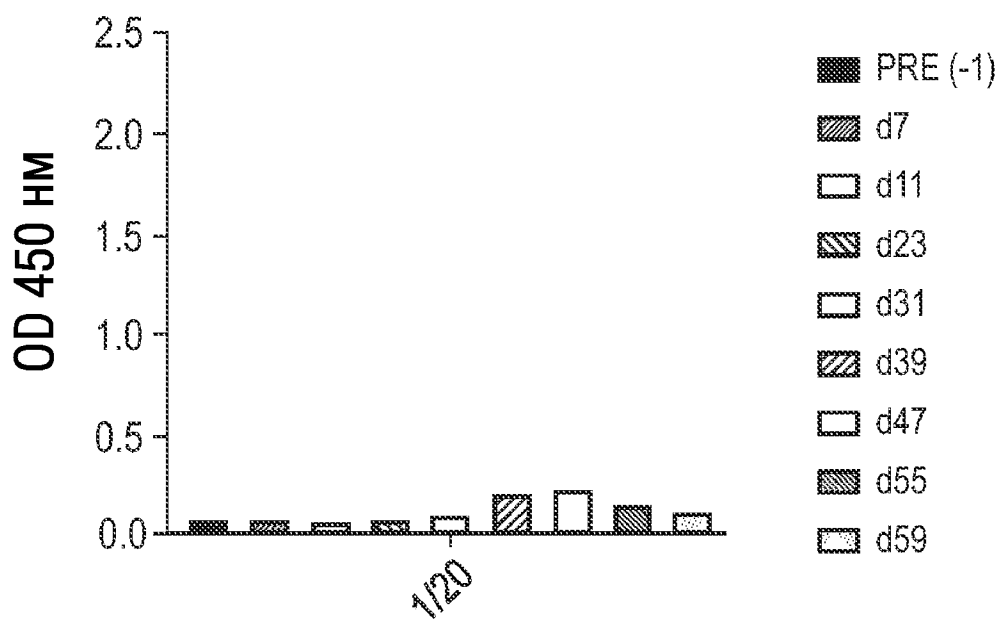
ФИГ.8С

АДА обезьяна 9



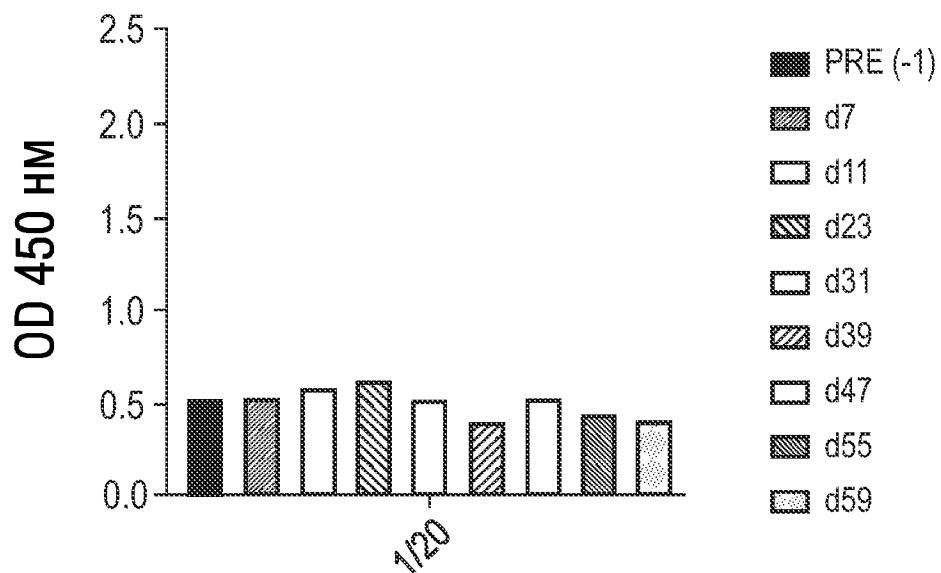
ФИГ.8D

АДА обезьяна 10



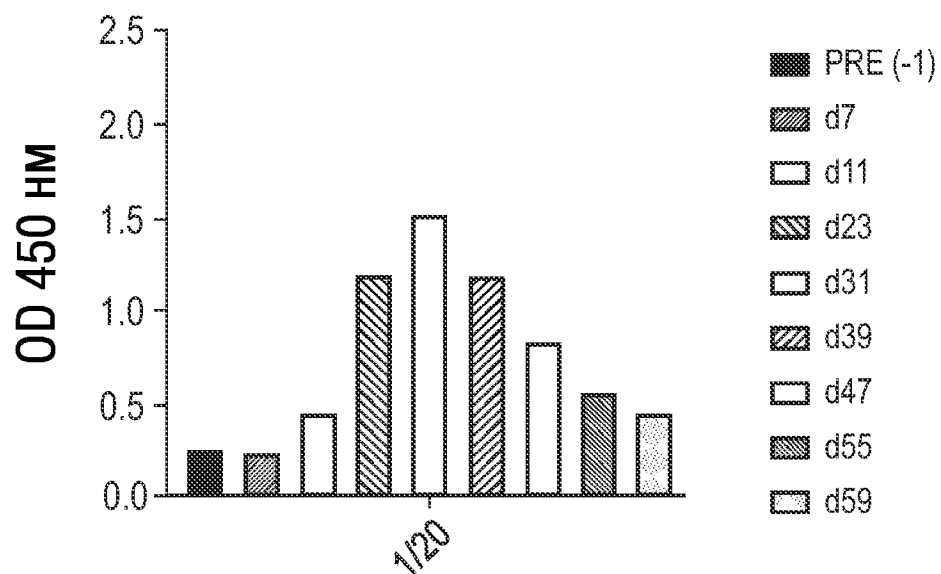
ФИГ.8Е

АДА обезьяна 15

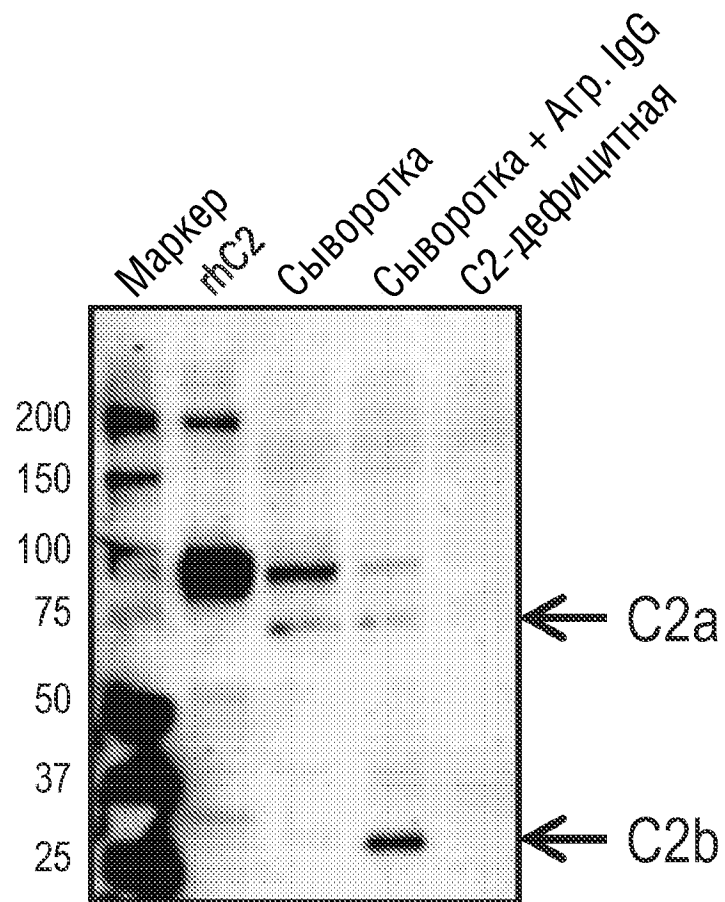


ФИГ.8F

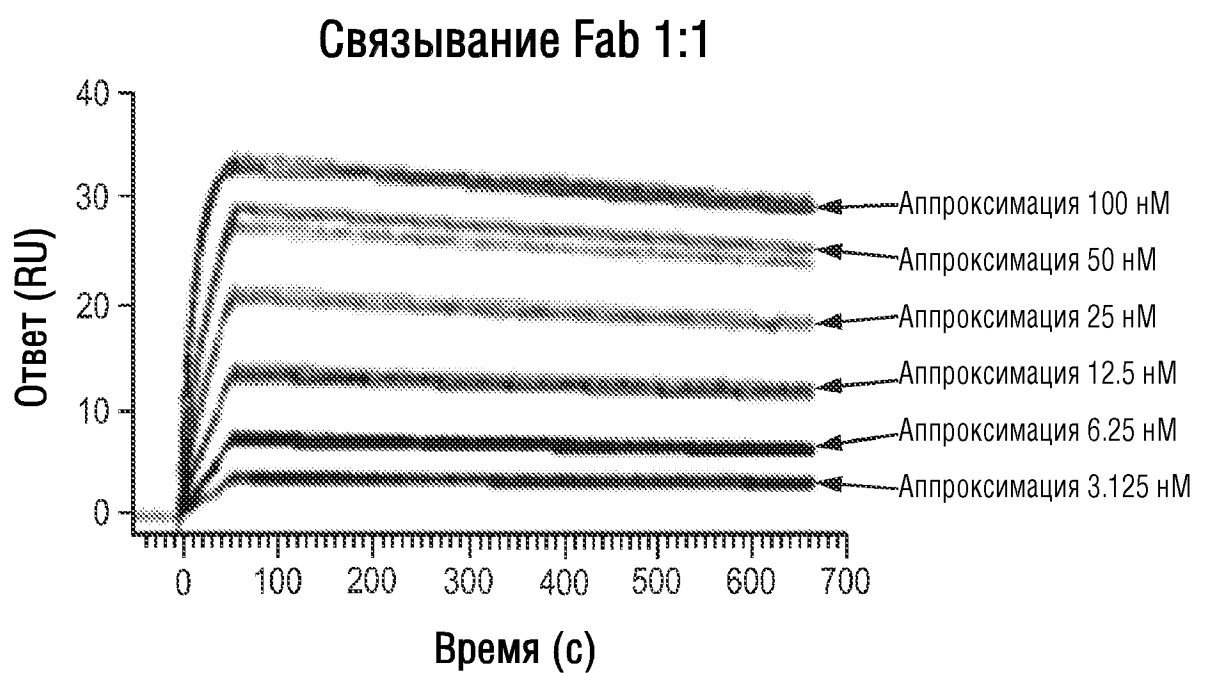
АДА обезьяна 16



ФИГ.9А

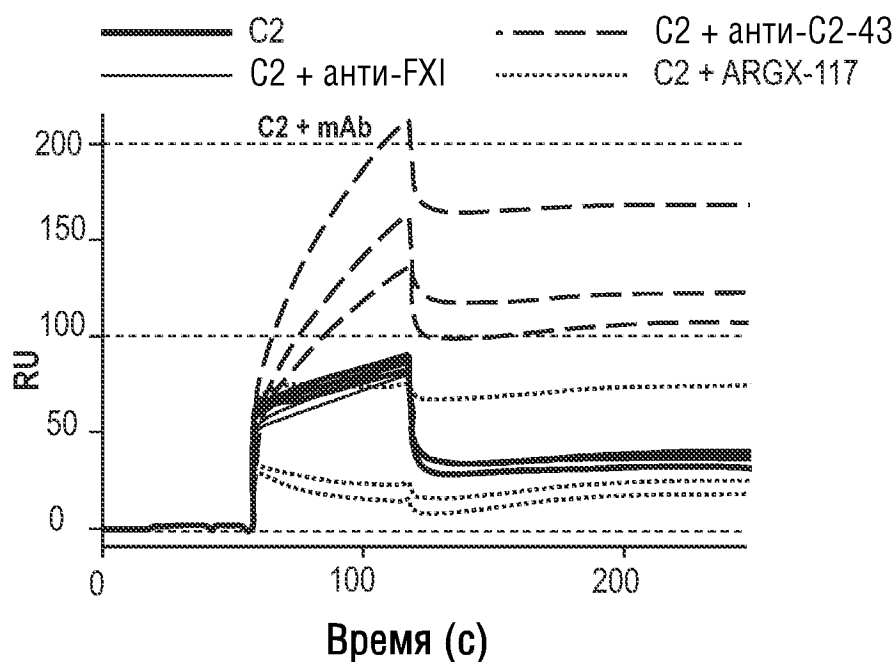


ФИГ.9В



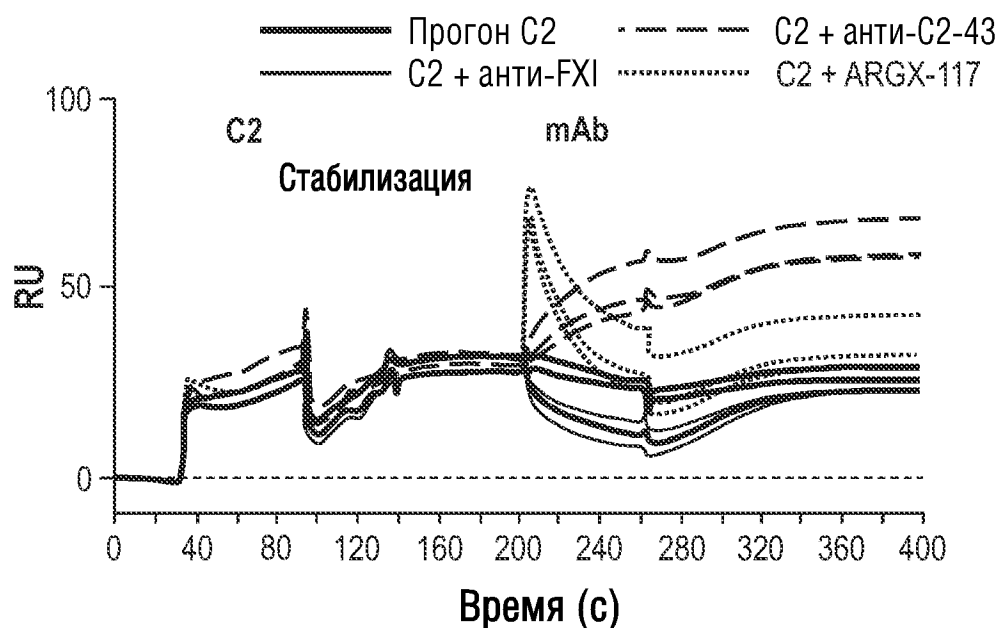
ФИГ.9C

Чип: биотин-C4b, Элюат: человеческий C2 +/- mAb
Цикл 7, 9 и 11

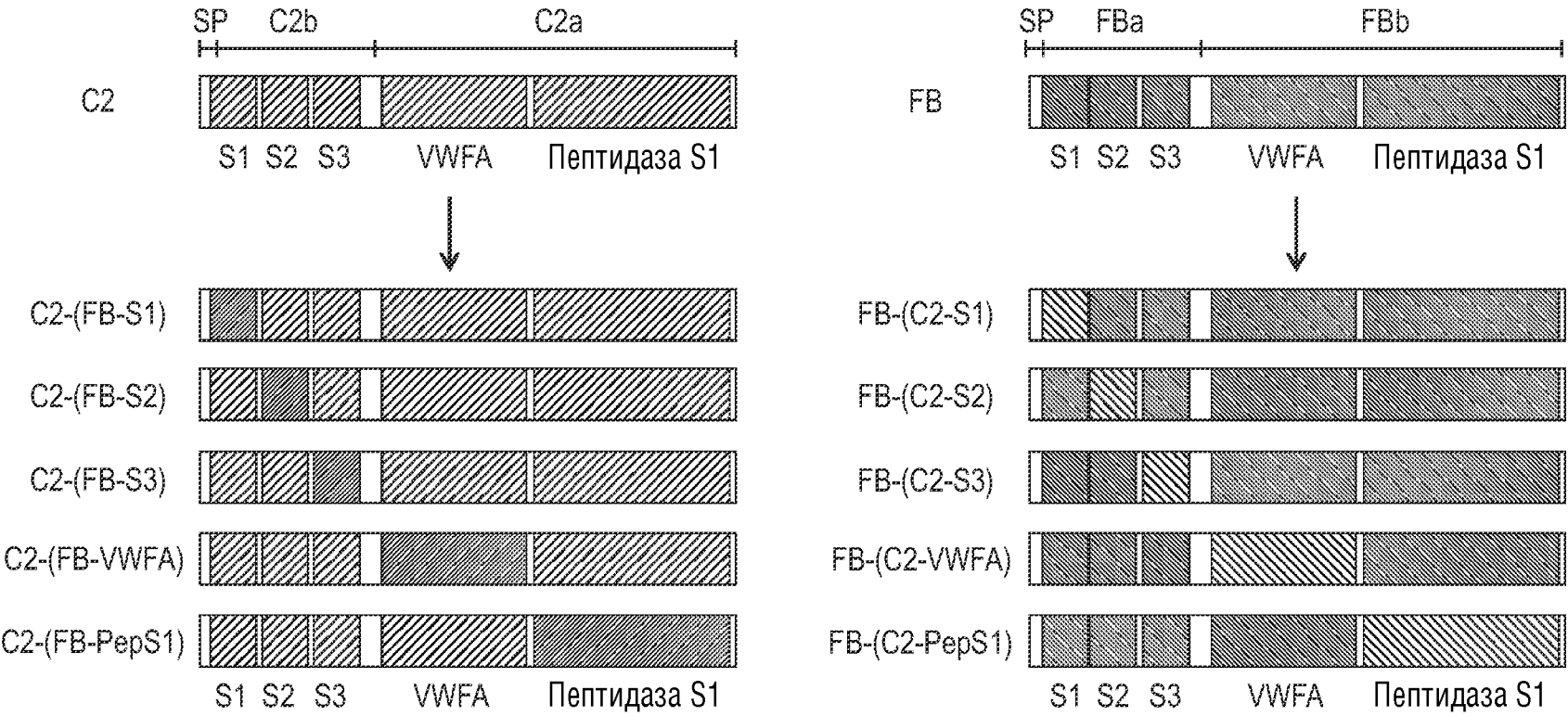


ФИГ.9D

Чип: биотин-C4b, Иммобилизованный: человеческий C2, Элюат: mAb
Цикл 19, 21 и 23

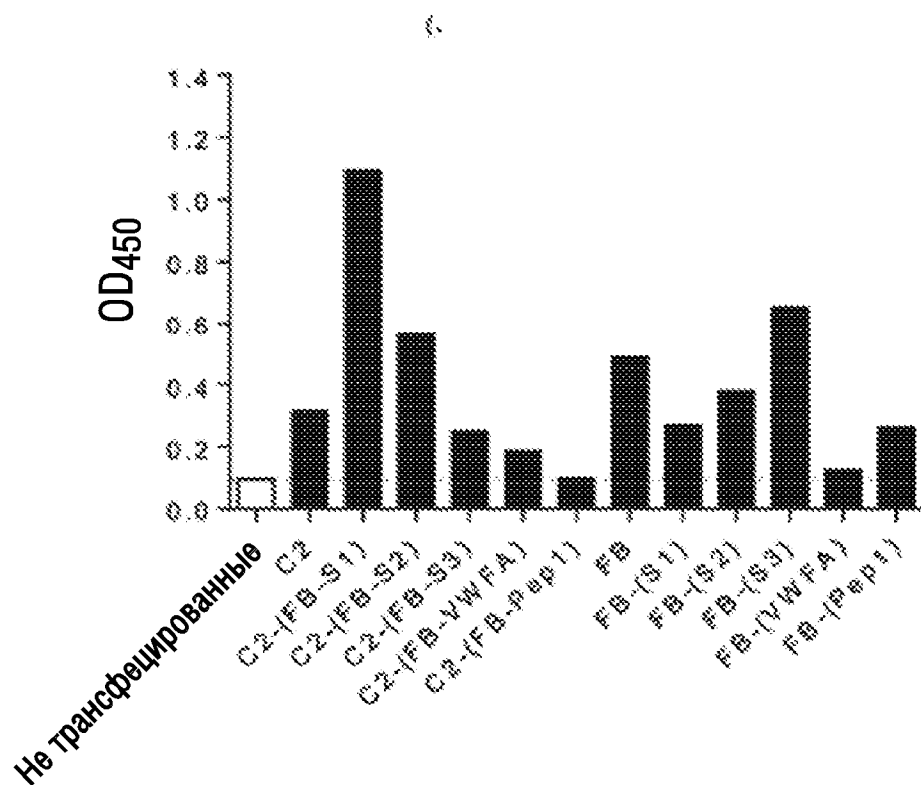


ФИГ.10



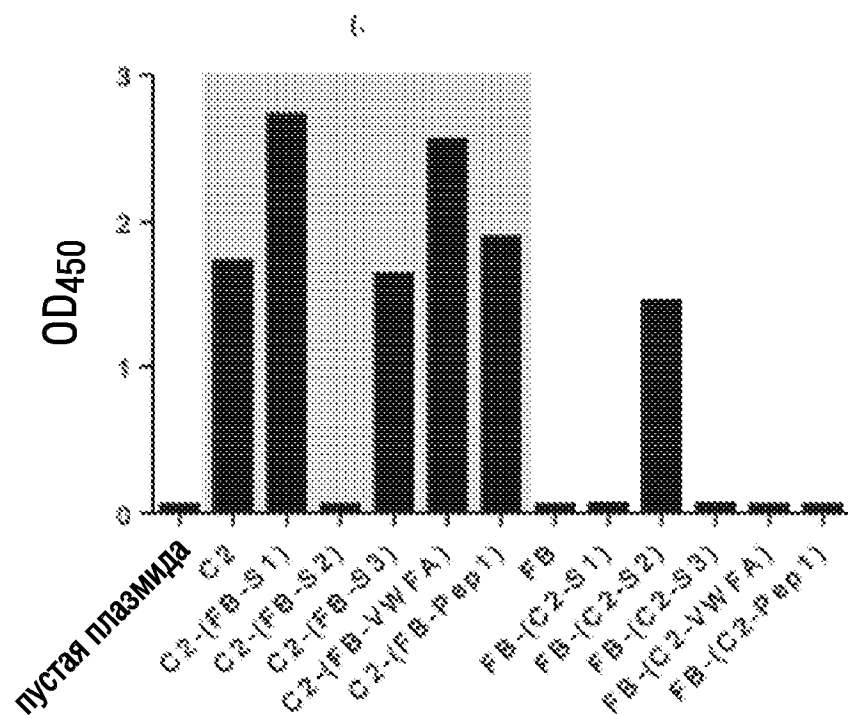
ФИГ.11

Анти-FLAG ИФА на мутантах с обменом доменами



ФИГ.12

Мутанты с обменом доменами - hu5F2.4

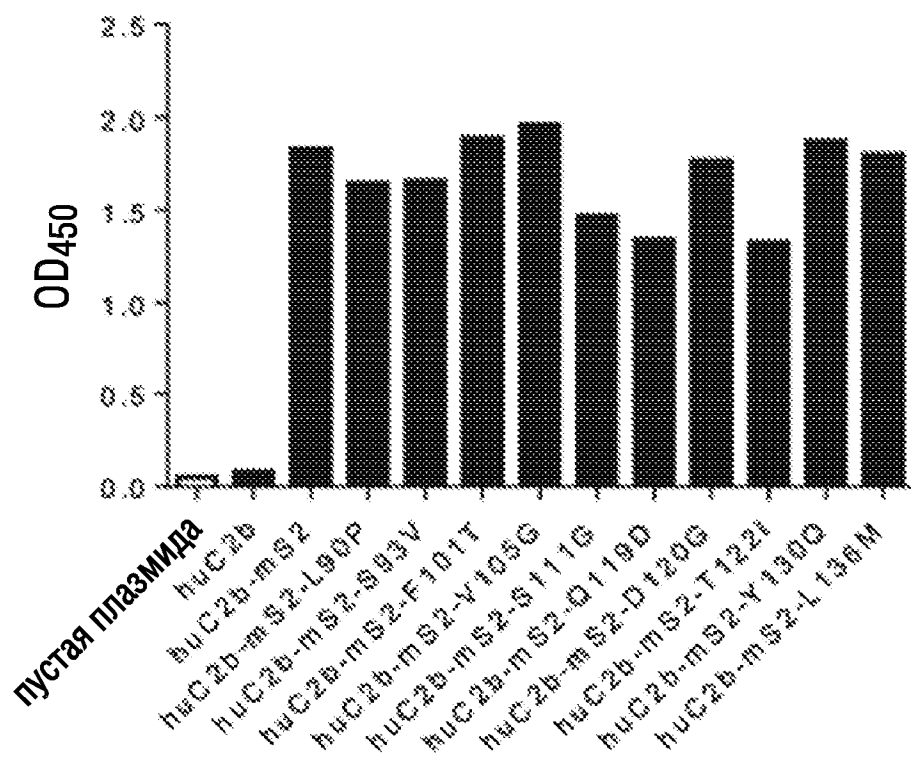


ФИГ.13

Человеческий S2	VRCPAPVSFENGIYTPRLGSYPVGGNVSFECEDGFILRGSPVRQCRPNGMWDGETAVCDNG
Мышиный S2	VRCLAPSSFENGIYFPRLVSYPVGSNVSECEQDFTLRGSPVRYCRPNGLWDGETAVCDNG
	*** ** ***** *** ***** ***** * ***** ***** *****

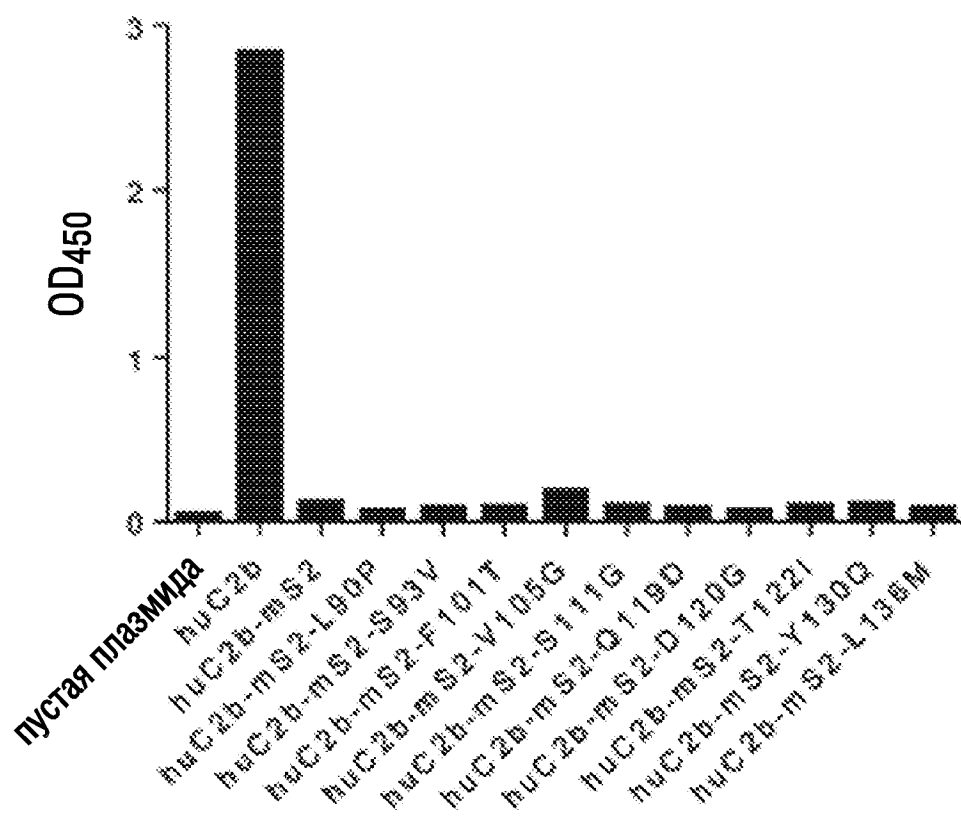
ФИГ.14

Анти-FLAG ИФА на мутантах точного картирования



ФИГ.15

Мутанты точного картирования - hu5F2.4



ФИГ.16

Кластер 1

Человеческий C2	VRCPAPVSFENGIYTPRLGSYPVGGNVSFECED DGF ILRGSPVRQCRPNGMWDGETAVCDNG
Мышиный C2	VRCLAPSSFENGIYFPRLVSYPVGSNVSFECEDQDFTLRGSPVRYCRPNGLWDGETAVCDNG
	*** ** ***** ** * ***** ***** * ***** ***** *****

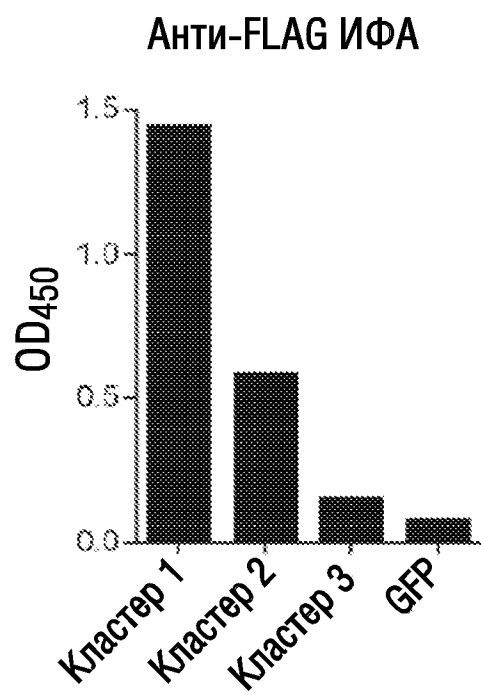
Кластер 2

Человеческий C2	VRCPAPVSFENGIYTPRLGSYPVG G NVSFECEDGFILRGSPVR Q CRPNG M WDGETAVCDNG
Мышиный C2	VRCLAPSSFENGIYFPRLVSYPVGSNVSFECEDQDFTLRGSPVRYCRPNGLWDGETAVCDNG
	*** ** ***** ** * ***** ***** * ***** ***** *****

Кластер 3

Человеческий C2	VRCPAPVSFENGIY T PR L GSYPVG G NVSFECEDGFILRGSPVR Q CRPNGMWDGETAVCDNG
Мышиный C2	VRCLAPSSFENGIYFPRLVSYPVGSNVSFECEDQDFTLRGSPVRYCRPNGLWDGETAVCDNG
	*** ** ***** ** * ***** ***** * ***** ***** *****

ФИГ.17А



ФИГ.17В

