

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041304**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.06

(21) Номер заявки
201791366

(22) Дата подачи заявки
2015.12.18

(51) Int. Cl. **C07K 16/36** (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/02 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИ-C5 АНТИТЕЛА С БОЛЕЕ ВЫСОКОЙ АФФИННОСТЬЮ ПРИ pH 7,4, ЧЕМ ПРИ pH 5,8 (ВАРИАНТЫ)

(31) 2014-257647

(32) 2014.12.19

(33) JP

(43) 2018.02.28

(86) PCT/JP2015/006321

(87) WO 2016/098356 2016.06.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЧУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ
КАЙСЯ (JP)**

(72) Изобретатель:
Руйке Ёсинао, Сампей Дзендзиро (SG)

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) WO-A1-2008113834
MOLLNES T.E. et al., Identification of a Human C5 β -Chain Epitope Exposed in the Native Complement Component but Concealed in the SC5b-9 Complex, Scand. J. Immunol, 1988, Vol.28, p.307-312
WO-A1-2011111007
WO-A1-2013138680
WO-A1-2013152001
WO-A1-2014028354
HAVILAND, David L. et al., Complete cDNA sequence of human complement pro-C5 evidence of truncated transcripts derived from a single copy gene., The Journal of Immunology, 1991, Vol. 146, No. 1, p.362-368
WO-A1-2015134894

(57) Изобретение относится к способам получения анти-C5 антител с более высокой аффинностью при pH 7,4, чем при pH 5,8, которые можно применять в качестве лекарственных средств. Эти способы предполагают иммунизацию животного полипептидом, который включает область, соответствующую аминокислотам в положениях 33-124 бета-цепи C5 (SEQ ID NO: 40), или входящие в ее состав фрагменты 47-57, 70-76 и 107-110 бета-цепи C5, с последующим выделением нуклеиновой кислоты, кодирующей анти-C5 антитело, и культивированием клетки-хозяина, содержащей эту нуклеиновую кислоту, где полученное анти-C5 антитело связывается с эпитопом, содержащим по меньшей мере один указанный фрагмент.

B1

041304

**041304
B1**

Настоящее изобретение относится к антителам к C5 и способам их применения.

Предпосылки создания изобретения

Система комплемента играет центральную роль в клиренсе иммунных комплексов и иммунных ответов на инфекционные агенты, чужие антигены, инфицированные вирусом клетки и опухолевые клетки. Известно примерно 25-30 белков комплемента, которые присутствуют в виде сложной группы плазматических белков и мембранных кофакторов. Компоненты комплемента осуществляют свои иммунные защитные функции путем участия в серии сложных ферментативных расщеплений и случаев связываний с мембраной. В результате каскады системы комплемента приводят к получению продуктов, обладающих опсоническими, иммунорегуляторными и литическими функциями.

В настоящее время общепринято считать, что система комплемента может активироваться тремя различными путями: классическим путем, лектиновым путем и альтернативным путем. В этих путях участвует много компонентов, и хотя они различаются своими начальными стадиями, затем они сходятся и включают одни и те же терминальные компоненты системы комплемента (с C5 по C9), которые ответственны за активацию и деструкцию клеток-мишеней.

Классический путь, как правило, активируется при образовании комплексов антиген-антитело. Независимо от этого первая стадия активации лектинового пути представляет собой связывание специфических лектинов, таких как маннан-связывающий лектин (MBL), Н-фиколин, М-фиколин, L-фиколин и лектин С-типа CL-11. В отличие от этого, альтернативный путь подвергается активации спонтанно с низким уровнем турновера, которая легко может повышаться на чужих или других аномальных поверхностях (бактерии, дрожжи, инфицированные вирусом клетки или поврежденная ткань). Эти пути сходятся в точке, в которой происходит расщепление компонента комплемента C3 активной протеазой с образованием C3a и C3b.

C3a представляет собой анафилатоксин. C3b связывается с бактериальными и другими клетками, а также с определенными вирусами и иммунными комплексами, и метит их для удаления из кровотока (играет роль опсонина). C3b формирует также комплекс с другими компонентами с образованием конвертазы C5, которая расщепляет C5 с образованием C5a и C5b.

C5 представляет собой белок с молекулярной массой 190 кДа, который присутствует в сыворотке здорового индивидуума в концентрации примерно 80 мкг/мл (0,4 мкМ). C5 гликозилирован, при этом примерно 1,5-3% его массы приходится на долю углевода. Зрелый C5 представляет собой гетеродимер, в котором альфа-цепь с молекулярной массой 115 кДа сцеплена дисульфидом с бета-цепью с молекулярной массой 75 кДа. C5 синтезируется в виде одноцепочечного белка-предшественника (предшественник про-C5), состоящего из 1676 аминокислот (см., например, PTL1 и PTL2). Предшественник про-C5 расщепляется с высвобождением бета-цепи в виде аминоконцевого фрагмента и альфа-цепи в виде карбокси-концевого фрагмента. Полипептидные фрагменты, представляющие собой альфа-цепь и бета-цепь, соединяются друг с другом посредством дисульфидной связи с образованием зрелого белка C5.

Зрелый C5 расщепляется с образованием C5a- и C5b-фрагмента в процессе активации путей системы комплемента. В результате воздействия C5-конвертазы C5a отщепляется от альфа-цепи C5 в виде аминоконцевого фрагмента, содержащего первые 74 аминокислоты альфа-цепи. Оставшаяся часть зрелого C5 представляет собой C5b-фрагмент, который содержит остаток альфа-цепи, соединенный дисульфидом с бета-цепью. Примерно 20% массы C5a, составляющей 11 кДа, приходится на долю углевода.

C5a представляет собой другой анафилатоксин. C5b объединяется с C6, C7, C8 и C9 с образованием мембраноатакующего комплекса (MAC, C5b-9, комплекс терминальных компонентов системы комплемента (ТСС)) на поверхности клетки-мишени. Когда в мембраны клеток мишеней встраиваются в достаточном количестве MAC, то поры, образованные MAC, опосредуют быстрый осмотический лизис клеток мишеней.

Как указано выше, C3a и C5a являются анафилатоксинами. Они могут запускать дегрануляцию тучных клеток, что вызывает высвобождение гистамина и других медиаторов воспаления, которые приводят к сокращению гладких мышц, повышению проницаемости сосудов, активации лейкоцитов и другим проявлениям воспаления, включая клеточную пролиферацию, приводящую к повышенному содержанию паренхиматозных клеток. C5a функционирует также в качестве хемотаксического пептида, который служит для привлечения гранулоцитов, таких как нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и моноциты, к области активации комплемента.

Активность C5a регулируется плазматическим ферментом карбоксипептидазой N, которая удаляет карбокси-концевой аргинин из C5a, что приводит к образованию производного C5a-des-Arg. C5a-des-Arg обладает лишь 1% анафилактической активности и полиморфоядерной хемотаксической активности, присущей немодифицированному C5a.

В то время как правильно функционирующая система комплемента обеспечивает эффективную защиту от инфицирующих микроорганизмов, неправильная регуляция или активация системы комплемента участвует в патогенезе различных нарушений, включая, например, ревматоидный артрит (РА); волчаночный нефрит; повреждение, вызываемое ишемией-реперфузией; пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH); атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS); болезнь плотных депозитов (DDD); дегенерацию желтого пятна (например, возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD)); синдром: гемо-

лиз, повышение активности ферментов печени и тромбоцитопения (HELLP); тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП); спонтанную потерю плода; васкулит с гипокомплементемией; буллезный эпидермолиз; повторную потерю плода; рассеянный склероз (MS); травматическое повреждение головного мозга и повреждение, обусловленное инфарктом миокарда, сердечно-легочным шунтированием и гемодиализом (см., например, NPL1). Таким образом, ингибирование избыточной или неконтролируемой активации каскада комплемента может оказывать благоприятное клиническое действие на пациентов с указанными нарушениями.

Пароксизмальная ночная гемоглинурия (PNH) представляет собой редкое нарушение крови, при котором эритроциты имеют дефекты и поэтому разрушаются быстрее, чем здоровые эритроциты. PNH обусловлена клональной экспансией гематопоэтических стволовых клеток с соматическими мутациями в гене PIG-A (фосфатидилинозитолгликан класса А), локализованном на X-хромосоме. Мутации в PIG-A приводят к ранней блокаде синтеза гликозилфосфатидилинозитола (GPI), молекулы, которая требуется для "заякоривания" многих белков на клеточных поверхностях. В результате при PNH кровяные клетки характеризуются дефицитом GPI-заякоренных белков, которые включают комплемент-регулирующие белки CD55 и CD59. В нормальных ситуациях эти комплемент-регулирующие белки блокируют образование MAC на клеточных поверхностях, предупреждая тем самым лизис эритроцитов. Отсутствие GPI-заякоренных белков вызывает опосредуемый системой комплемента гемолиз при PNH.

PNH характеризуется гемолитической анемией (пониженное количество эритроцитов), гемоглинурией (присутствие гемоглобина в моче, что особенно проявляется после сна) и гемоглобинемией (присутствие гемоглобина в кровотоке). Известно, что пораженных PNH индивидуумов имеют место пароксизмы, которые в данном случае представляют собой случаи появления темно-окрашенной мочи. Гемолитическая анемия обусловлена внутрисосудистой деструкцией эритроцитов компонентами системы комплемента. Другие известные симптомы включают дисплазию, усталость, эректильную дисфункцию, тромбоз и повторяющуюся боль в брюшной области.

Экулизумаб представляет собой гуманизированное моноклональное антитело к белку C5 системы комплемента, и он является терапевтическим средством первой линии, которое разрешено для лечения пароксизмальной ночной гемоглинурии (PNH) и атипического гемолитико-уремического синдрома (aHUS) (см., например, NPL2). Экулизумаб ингибирует расщепление C5 C5-конвертазой с образованием C5a и C5b, что предупреждает образование комплекса терминальных компонентов системы комплемента C5b-9. И C5a, и C5b-9 вызывают опосредуемые терминальным комплексом системы комплемента события, характерные для PNH и aHUS (см. также PTL3, PTL4, PTL5 и PTL6).

В нескольких публикациях описаны антитела к C5. Например, в WO 95/29697 (PTL7) описано антитело к C5, которое связывается с альфа-цепью C5, но не связывается с C5a, и блокирует активацию C5, а в WO 2002/30985 (PTL8) описано моноклональное антитело к C5, которое ингибирует образование C5a. С другой стороны, в WO 2004/007553 (PTL9) описано антитело к C5, которое распознает сайт протеолитического расщепления конвертазой C5 на альфа-цепи C5 и ингибирует превращение C5 в C5a и C5b. В WO 2010/015608 (PTL10) описано антитело к C5, которое характеризуется константой аффинности, составляющей по меньшей мере $1 \times 10^{-7} \text{M}^{-1}$.

Антитела (IgG) связываются с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) и характеризуются продолжительными временами удерживания в плазме. Связывание IgG с FcRn, как правило, имеет место в кислых условиях (например, при pH 6,0) и редко происходит в нейтральных условиях (например, при pH 7,4). Как правило, IgG неспецифически встраиваются в клетки посредством эндоцитоза и возвращаются на клеточные поверхности посредством связывания с эндосомальным FcRn в кислых условиях в эндосомах. Затем IgG отделяются от FcRn в результате диссоциации в нейтральных условиях в плазме. IgG, которым не удалось связаться с FcRn, расщепляются в лизосомах. Если способность IgG к связыванию с FcRn в кислых условиях устраняют путем интродукции мутаций в его Fc-область, то IgG не возвращается из эндосом в плазму, что приводит к заметному снижению удерживания IgG в плазме. Опубликован метод, позволяющий повышать его связывание с FcRn в кислых условиях, предназначенный для повышения удерживания IgG в плазме. Когда связывание IgG с FcRn в кислых условиях повышают путем интродукции аминокислотной замены в его Fc-область, то IgG более эффективно возвращается из эндосом в плазму, и в результате повышается его удерживание в плазме. Кроме того, опубликованы также данные о том, что IgG с повышенной способностью к связыванию с FcRn в нейтральных условиях не отделяется путем диссоциации от FcRn в нейтральных условиях в плазме, даже если он возвращается на клеточную поверхность благодаря его связыванию с FcRn в кислых условиях в эндосомах, и следовательно, его удерживание в плазме не изменяется или, скорее, ухудшается (см., например, NPL3; NPL4; NPL5).

В последние годы были описаны антитела, которые связываются с антигенами pH-зависимым образом (см., например, PTL11 и PTL12). Указанные антитела более сильно связываются с антигенами в нейтральных условиях в плазме и отделяются путем диссоциации от антигенов в кислых условиях, которые имеют место в эндосомах. После отделения путем диссоциации от антигенов антитела вновь приобретают способность связываться с антигенами, когда они возвращаются в плазму посредством FcRn. Таким образом, одна молекула антитела может повторно связываться с несколькими молекулами антигена. В целом, время удерживания антигена в плазме намного короче, чем время удерживания антитела, которое

обладает указанным выше FcRn-опосредуемым механизмом рециклинга. Таким образом, когда антиген связан с антителом, то антиген в норме характеризуется пролонгированным удерживанием в плазме, что приводит к повышению концентрации антигена в плазме. С другой стороны, было установлено, что описанные выше антитела, которые связываются с антигенами рН-зависимым образом, позволяют элиминировать антигены из плазмы быстрее, чем типичные антитела, поскольку они отделяются путем диссоциации от антигенов в эндосомах в процессе FcRn-опосредуемого рециклинга. В WO 2011/111007 (PTL13) описан также основанный на компьютерном моделировании анализ, демонстрирующий, что антитело к C5, обладающее рН-зависимым связыванием, может усиливать выключение антигена.

Перечень ссылок.

Патентная литература.

[PTL1] патент США № 6355245,

[PTL2] патент США № 7432356,

[PTL3] WO 2005/074607,

[PTL4] WO 2007/106585,

[PTL5] WO 2008/069889,

[PTL6] WO 2010/054403,

[PTL7] WO 95/29697,

[PTL8] WO 2002/30985,

[PTL9] WO 2004/007553,

[PTL10] WO 2010/015608,

[PTL11] WO 2009/125825,

[PTL12] WO 2011/122011,

[PTL13] WO 2011/111007,

Непатентная литература.

[NPL1] Holers и др., Immunol. Rev. 223, 2008, сс. 300-316,

[NPL2] Dmytrijuk и др., The Oncologist 13(9), 2008, сс. 993-1000,

[NPL3] Yeung и др., J Immunol. 182(12), 2009, сс. 7663-7671,

[NPL4] Datta-Mannan и др., J Biol. Chem. 282(3), 2007, сс. 1709-1717,

[NPL5] Dall'Acqua и др., J. Immunol. 169(9), 2002, сс. 5171-5180.

Краткое изложение сущности изобретения

В изобретении предложены антитела к C5 и способы их применения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, связывается с эпитопом на бета-цепи C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, связывается с эпитопом в MG1-MG2-домене бета-цепи C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, связывается с эпитопом во фрагменте, состоящем из аминокислот 33-124 бета-цепи (SEQ ID NO: 40) C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, связывается с эпитопом в бета-цепи (SEQ ID NO: 40) C5, который содержит по меньшей мере один фрагмент, выбранный из группы, состоящей из аминокислот 47-57, 70-76 и 107-110. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, связывается с эпитопом во фрагменте бета-цепи (SEQ ID NO: 40) C5, который содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109 и His110 SEQ ID NO: 40. В других вариантах осуществления изобретения антитело связывается с C5 с более высокой аффинностью при нейтральном рН, чем при кислом рН. В других вариантах осуществления изобретения антитело связывается с C5 с более высокой аффинностью при рН 7,4, чем при рН 5,8. В другом варианте осуществления изобретения выделенное антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, связывается с тем же эпитопом, что и антитело, описанное в табл. 2. В других вариантах осуществления изобретения антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело, описанное в табл. 2, с более высокой аффинностью при рН 7,4, чем при рН 5,8. В следующем варианте осуществления изобретения антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, связывается с тем же эпитопом, что и антитело, описанное в табл. 7 или 8. В других вариантах осуществления изобретения антитело связывается тем же эпитопом, что и антитело, описанное в табл. 7 или 8, с более высокой аффинностью при рН 7,4, чем при рН 5,8.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, конкурирует за связывание с C5 с антителом, содержащим пару VH и VL, которая выбрана из: (а) VH, имеющей SEQ ID NO: 1, и VL, имеющей SEQ ID NO: 11; (б) VH, имеющей SEQ ID NO: 5, и VL, имеющей SEQ ID NO: 15; (в) VH, имеющей SEQ ID NO: 4, и VL, имеющей SEQ ID NO: 14; (г) VH, имеющей SEQ ID NO: 6, и VL, имеющей SEQ ID NO: 16; (д) VH, имеющей SEQ ID NO: 2, и VL, имеющей SEQ ID NO: 12; (е) VH, имеющей SEQ ID NO: 3, и VL, имеющей SEQ ID NO: 13; (ж) VH, имеющей SEQ ID NO: 9, и VL, имеющей SEQ ID NO: 19; (з) VH, имеющей SEQ ID NO: 7, и VL, имеющей SEQ ID NO: 17; (и) VH, имеющей SEQ ID NO: 8, и VL, имеющей SEQ ID NO: 18; и (к) VH, имеющей SEQ ID NO: 10, и VL, имеющей SEQ ID NO: 20. В других вариантах осуществления изобретения антитело к C5 связывается с C5 с более высокой аффинностью при нейтральном pH, чем при кислом pH. В других вариантах осуществления изобретения антитело к C5 связывается с C5 с более высокой аффинностью при pH 7,4, чем при pH 5,8.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, обладает характеристикой, выбранной из группы, состоящей из следующих характеристик: (а) антитело контактирует с аминокислотами D51 и K109 C5 (SEQ ID NO: 39); (б) аффинность антитела к C5 (SEQ ID NO: 39) выше, чем аффинность антитела к мутантному C5, содержащую замену E48A в SEQ ID NO: 39; или (в) антитело связывается с белком C5, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, при pH 7,4, но не связывается с белком C5, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39 с заменой H72Y, при pH 7,4. В других вариантах осуществления изобретения антитело связывается с C5 с более высокой аффинностью при нейтральном pH, чем при кислом pH. В других вариантах осуществления изобретения антитело связывается с C5 с более высокой аффинностью при pH 7,4, чем при pH 5,8.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, ингибирует активацию C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное антитело к C5 предлагаемое в настоящем изобретении, ингибирует активацию R885H-варианта C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения, выделенное антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное антитело к C5 предлагаемое в настоящем изобретении, представляет собой человеческое, гуманизированное или химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, представляет собой фрагмент антитела, которое связывается с C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, представляет собой полноразмерное антитело IgG1- или IgG4-класса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит (а) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность DX₁GYX₂X₃PTHAMX₄X₅, в которой X₁ обозначает G или A, X₂ обозначает V, Q или D, X₃ обозначает T или Y, X₄ обозначает Y или H, X₅ обозначает L или Y (SEQ ID NO: 128), (б) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность QX₁TX₂VGSSYGNX₃, в которой X₁ обозначает S, C, N или T, X₂ обозначает F или K, X₃ обозначает A, T или H (SEQ ID NO: 131), и (в) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность X₁IX₂TGSGAX₃YX₄AX₅WX₆KG, в которой X₁ обозначает C, A или G, X₂ обозначает Y или F, X₃ обозначает T, D или E, X₄ обозначает Y, K или Q, X₅ обозначает S, D или E, X₆ обозначает A или V (SEQ ID NO: 127).

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит (а) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SSYYX₁X₂, в которой X₁ обозначает M или V, X₂ обозначает C или A (SEQ ID NO: 126), (б) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность X₁IX₂TGSGAX₃YX₄AX₅WX₆KG, в которой X₁ обозначает C, A или G, X₂ обозначает Y или F, X₃ обозначает T, D или E, X₄ обозначает Y, K или Q, X₅ обозначает S, D или E, X₆ обозначает A или V (SEQ ID NO: 127), и (в) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность DX₁GYX₂X₃PTHAMX₄X₅, в которой X₁ обозначает G или A, X₂ обозначает V, Q или D, X₃ обозначает T или Y, X₄ обозначает Y или H, X₅ обозначает L или Y (SEQ ID NO: 128). В других вариантах осуществления изобретения антитело содержит (а) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность X₁ASQX₂IX₃SX₄LA, в которой X₁ обозначает Q или R, X₂ обозначает N, Q или G, X₃ обозначает G или S, X₄ обозначает D, K или S (SEQ ID NO: 129); (б) HVR-L2 содержит аминокислотную последовательность GASX₁X₂X₃S, в которой X₁ обозначает K, E или T, X₂ обозначает L или T, X₃ обозначает A, H, E или Q (SEQ ID NO: 130); и (в) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность QX₁TX₂VGSSYGNX₃, в которой X₁ обозначает S, C, N или T, X₂ обозначает F или K, X₃ обозначает A, T или H (SEQ ID NO: 131).

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит (а) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность X₁ASQX₂IX₃SX₄LA, в которой X₁ обозначает Q или R, X₂ обозначает N, Q или G, X₃ обозначает G или S, X₄ обозначает D, K или S (SEQ ID NO: 129); (б) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность GASX₁X₂X₃S, в которой X₁ обозначает K, E или T, X₂ обозначает L или T, X₃ обозначает A, H, E

или Q (SEQ ID NO: 130); и (в) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность QX₁TX₂VGSSYGNX₃, в которой X₁ обозначает S, C, N или T, X₂ обозначает F или K, X₃ обозначает A, T или H (SEQ ID NO: 131).

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит каркасный участок переменного домена тяжелой цепи FR1, содержащий одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 132-134; FR2, содержащий одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 135-136; FR3, содержащий одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 137-139; и FR4, содержащий одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 140-141. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит каркасный участок переменного домена легкой цепи FR1, содержащий одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 142-143; FR2, содержащий одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 144-145; FR3, содержащий одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 146-147; и FR4, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит (а) последовательность VH, идентичную по меньшей мере на 95% одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 10, 106-110; (б) последовательность VL, идентичную по меньшей мере на 95% одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 20, 111-113; или (в) последовательность VH, указанную в (а), и последовательность VL, указанную в (б). В других вариантах осуществления изобретения антитело содержит VH, имеющую одну из последовательностей SEQ ID NO: 10, 106-110. В других вариантах осуществления изобретения антитело содержит VL, имеющую одну из последовательностей SEQ ID NO: 20, 111-113.

В изобретении предложено антитело, содержащее VH, имеющую одну из последовательностей SEQ ID NO: 10, 106-110 и VL, имеющую одну из последовательностей SEQ ID NO: 20, 111-113.

В изобретении предложены также выделенные нуклеиновые кислоты, которые кодируют антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении. В изобретении предложены также клетки-хозяева, которые содержат нуклеиновую кислоту, предлагаемую в настоящем изобретении. В изобретении предложен также способ получения антитела, включающий культивирование клетки-хозяина, предлагаемой в настоящем изобретении, в результате чего получают антитело.

В изобретении предложен также способ получения антитела к C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает иммунизацию животного полипептидом, который содержит MG1-MG2-домен (SEQ ID NO: 43) бета-цепи C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает иммунизацию животного полипептидом, который содержит область, соответствующую аминокислотам в положениях 33-124 бета-цепи (SEQ ID NO: 40) C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает иммунизацию животного полипептидом, который содержит по меньшей мере один фрагмент, выбранный из аминокислот 47-57, 70-76 и 107-110 бета-цепи (SEQ ID NO: 40) C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает иммунизацию животного полипептидом, содержащим фрагмент бета-цепи (SEQ ID NO: 40) C5, который содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109 и His110.

В изобретении предложена также фармацевтическая композиция, которая содержит антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель.

В частности, в настоящем изобретении предложено.

1. Выделенное антитело, которое связывается с C5, где антитело связывается с эпитопом в бета-цепи C5 с более высокой аффинностью при нейтральном pH, чем при кислом pH.

2. Антитело по п.1, где антитело обладает характеристикой, выбранной из группы, состоящей из следующих характеристик:

(а) антитело контактирует с аминокислотами D51 и K109 C5 (SEQ ID NO: 39);

(б) аффинность антитела к C5 (SEQ ID NO: 39) больше, чем аффинность антитела к мутанту C5, имеющему SEQ ID NO: 39 с заменой E48A, и

(в) антитело связывается с белком C5, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, при pH 7,4, но не связывается с белком C5, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39 с заменой H72Y, при pH 7,4.

3. Антитело по п.1, где антитело конкурирует за связывание с C5 с антителом, содержащим пару VH и VL, выбранную из

(а) VH, имеющей SEQ ID NO: 1, и VL, имеющей SEQ ID NO: 11;

(б) VH, имеющей SEQ ID NO: 5, и VL, имеющей SEQ ID NO: 15;

(в) VH, имеющей SEQ ID NO: 4, и VL, имеющей SEQ ID NO: 14;

(г) VH, имеющей SEQ ID NO: 6, и VL, имеющей SEQ ID NO: 16;

(д) VH, имеющей SEQ ID NO: 2, и VL, имеющей SEQ ID NO: 12;

(е) VH, имеющей SEQ ID NO: 3, и VL, имеющей SEQ ID NO: 13;

(ж) VH, имеющей SEQ ID NO: 9, и VL, имеющей SEQ ID NO: 19;

(з) VH, имеющей SEQ ID NO: 7, и VL, имеющей SEQ ID NO: 17;

(и) VH, имеющей SEQ ID NO: 8, и VL, имеющей SEQ ID NO: 18 и

(к) VH, имеющей SEQ ID NO: 10, и VL, имеющей SEQ ID NO: 20.

4. Антитело по одному из пп.1-3, где антитело связывается с эпитопом в MG1-MG2-домене бета-цепи C5.

5. Антитело по одному из пп.1-4, где антитело связывается с эпитопом во фрагменте, состоящем из аминокислот 33-124 бета-цепи (SEQ ID NO: 40) C5.

6. Антитело по одному из пп.1-5, где антитело связывается с эпитопом в бета-цепи (SEQ ID NO: 40) C5, который содержит по меньшей мере один фрагмент, выбранный из группы, которая состоит из аминокислот 47-57, 70-76 и 107-110.

7. Антитело по одному из пп.1-6, где антитело связывается с эпитопом во фрагменте бета-цепи (SEQ ID NO: 40) C5, который содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, которая состоит из Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109 и His110.

8. Антитело по одному из пп.1-7, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело, описанное в табл. 2, 7 или 8.

9. Антитело по одному из пп.1-8, которое ингибирует активацию C5.

10. Антитело по одному из пп.1-9, которое ингибирует активацию R885H-варианта C5.

11. Антитело по одному из пп.1-10, которое представляет собой моноклональное антитело.

12. Антитело по одному из пп.1-11, которое представляет собой человеческое, гуманизированное, или химерное антитело.

13. Антитело по одному из пп.1-12, которое представляет собой фрагмент антитела, связывающийся с C5.

14. Антитело по одному из пп.1-13, где антитело содержит (а) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность $DX_1GYX_2X_3PTHAMX_4X_5$, где X_1 обозначает G или A, X_2 обозначает V, Q или D, X_3 обозначает T или Y, X_4 обозначает Y или H, X_5 обозначает L или Y (SEQ ID NO: 128), (б) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность $QX_1TX_2VGSSYGNX_3$, в которой X_1 обозначает S, C, N или T, X_2 обозначает F или K, X_3 обозначает A, T или H (SEQ ID NO: 131), и (в) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность $X_1IX_2TGSGAX_3YX_4AX_5WX_6KG$, в которой X_1 обозначает C, A или G, X_2 обозначает Y или F, X_3 обозначает T, D или E, X_4 обозначает Y, K или Q, X_5 обозначает S, D или E, X_6 обозначает A или V (SEQ ID NO: 127).

15. Антитело по одному из пп.1-13, где антитело содержит (а) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность $SSYYX_1X_2$, в которой X_1 обозначает M или V, X_2 обозначает C или A (SEQ ID NO: 126), (б) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность $X_1IX_2TGSGAX_3YX_4AX_5WX_6KG$, в которой X_1 обозначает C, A или G, X_2 обозначает Y или F, X_3 обозначает T, D или E, X_4 обозначает Y, K или Q, X_5 обозначает S, D или E, X_6 обозначает A или V (SEQ ID NO: 127), и (в) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность $DX_1GYX_2X_3PTHAMX_4X_5$, в которой X_1 обозначает G или A, X_2 обозначает V, Q или D, X_3 обозначает T или Y, X_4 обозначает Y или H, X_5 обозначает L или Y (SEQ ID NO: 128).

16. Антитело по п.15, которое дополнительно содержит (а) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность $X_1ASQX_2IX_3SX_4LA$, в которой X_1 обозначает Q или R, X_2 обозначает N, Q или G, X_3 обозначает G или S, X_4 обозначает D, K или S (SEQ ID NO: 129); (б) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность $GASX_1X_2X_3S$, в которой X_1 обозначает K, E или T, X_2 обозначает L или T, X_3 обозначает A, H, E или Q (SEQ ID NO: 130); и (в) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность $QX_1TX_2VGSSYGNX_3$, в которой X_1 обозначает S, C, N или T, X_2 обозначает F или K, X_3 обозначает A, T или H (SEQ ID NO: 131).

17. Антитело по одному из пп.1-13, которое содержит (а) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность $X_1ASQX_2IX_3SX_4LA$, в которой X_1 обозначает Q или R, X_2 обозначает N, Q или G, X_3 обозначает G или S, X_4 обозначает D, K или S (SEQ ID NO: 129); (б) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность $GASX_1X_2X_3S$, в которой X_1 обозначает K, E или T, X_2 обозначает L или T, X_3 обозначает A, H, E или Q (SEQ ID NO: 130) и (в) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность $QX_1TX_2VGSSYGNX_3$, в которой X_1 обозначает S, C, N или T, X_2 обозначает F или K, X_3 обозначает A, T или H (SEQ ID NO: 131).

18. Антитело по п.15, которое дополнительно содержит каркасный участок варибельного домена тяжелой цепи FR1, содержащий одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 132-134; FR2, содержащий одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 135-136; FR3, содержащий одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 137-139, и FR4, содержащий одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 140-141.

19. Антитело по п.17, которое дополнительно содержит каркасный участок варибельного домена легкой цепи FR1, содержащий одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 142-143; FR2, содержащий одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 144-145; FR3, содержащий одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 146-147, и FR4, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148.

20. Антитело по одному из пп.1-13, которое содержит (а) VH, последовательность которой по

меньшей мере на 95% идентична одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 10, 106-110; (б) VL, последовательность которой по меньшей мере на 95% идентична одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 20, 111-113, или (в) VH, последовательность которой указана в (а), и VL, последовательность которой указана в (б).

21. Антитело по п.20, которое содержит VH, имеющую одну из последовательностей SEQ ID NO: 10, 106-110.

22. Антитело по п.20, которое содержит VL, имеющую одну из последовательностей SEQ ID NO: 20, 111-113.

23. Антитело, которое содержит VH, имеющую одну из последовательностей SEQ ID NO: 10, 106-110, и VL, имеющую одну из последовательностей SEQ ID NO: 20, 111-113.

24. Антитело по одному из пп.1-23, которое представляет собой полноразмерное антитело IgG1-или IgG4-класса.

25. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по одному из пп.1-24.

26. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.25.

27. Способ получения антитела, включающий культивирование клетки-хозяина по п.26, в результате чего получают антитело.

28. Способ получения антитела к C5, включающий иммунизацию животного полипептидом, где полипептид содержит MG1-MG2-домен (SEQ ID NO: 43) бета-цепи C5.

29. Способ получения антитела к C5, включающий иммунизацию животного полипептидом, где полипептид содержит область, соответствующую аминокислотам в положениях 33-124 бета-цепи (SEQ ID NO: 40) C5.

30. Способ получения антитела к C5, включающий иммунизацию животного полипептидом, где полипептид содержит по меньшей мере один фрагмент, выбранный из аминокислот 47-57, 70-76 и 107-110 бета-цепи (SEQ ID NO: 40) C5.

31. Способ получения антитела к C5, включающий иммунизацию животного полипептидом, где полипептид содержит фрагмент бета-цепи (SEQ ID NO: 40) C5, который содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109 и His110.

32. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по одному из пп.1-24 и фармацевтически приемлемый носитель.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано следующее.

На фиг. 1 - группировка антител к C5 в зависимости от эпитопа, процедура которой описана в примере 2.2. Антитела, сгруппированные в "корзины" для одного и того же эпитопа, заключены в прямоугольники, выделенные жирными линиями.

На фиг. 2А - полученные методом BIACORE® сенсограммы для антител к C5 при pH 7,4 (сплошная линия) и при pH 5,8 (штриховая линия) для оценки зависимости от pH, как описано в примере 3.2. CFA0305, CFA0307, CFA0366, CFA0501, CFA0538 и CFA0599 представляют собой антитела, входящие в группу эпитопа В, как описано в примере 2.2.

На фиг. 2Б - полученные методом BIACORE® сенсограммы для антител к C5 при pH 7,4 (сплошная линия) и при pH 5,8 (штриховая линия) для оценки зависимости от pH, как описано в примере 3.2. CFA0666, CFA0672 и CFA0675 представляют собой антитела, входящие в группу эпитопа В, а CFA0330 и CFA0341 представляют собой антитела, входящие в группу эпитопа Б, как описано в примере 2.2. 305LO5 представляет собой гуманизованное антитело CFA0305, описанное в примере 2.3.

На фиг. 3 - результаты анализа методом вестерн-блоттинга связывания полученных из бета-цепи C5 фрагментов (аминокислоты 19-180, 161-340, 321-500 и 481-660 SEQ ID NO: 40), слитых с GST-меткой, как описано в примере 4.1. CFA0305, CFA0307, CFA0366, CFA0501, CFA0538, CFA0599, CFA0666, CFA0672 и CFA0675 представляют собой антитела, входящие в группу эпитопа В. Антитело к GST служило в качестве положительного контроля. Положения слитых с GST фрагментов C5 (46-49 кДа) указаны стрелкой.

На фиг. 4 - полученные методом BIACORE® сенсограммы, характеризующие связывание антител к C5 с MG1-MG2-доменом бета-цепи C5, как описано в примере 4.3. На верхней панели представлены результаты для CFA0305 (сплошная линия), CFA0307 (штриховая линия), CFA0366 (пунктирно-штриховая линия) и экулизумаба (пунктирная линия). На средней панели представлены результаты для CFA0501 (сплошная линия), CFA0599 (штриховая линия), CFA0538 (пунктирно-штриховая линия) и экулизумаба (пунктирная линия). На нижней панели представлены результаты для CFA0666 (сплошная линия), CFA0672 (штриховая линия), CFA0675 (пунктирно-штриховая линия) и экулизумаба (пунктирная линия). CFA0305, CFA0307, CFA0366, CFA0501, CFA0538, CFA0599, CFA0666, CFA0672 и CFA0675 представляют собой антитела, входящие в группу эпитопа В. Экулизумаб применяли в качестве контрольного антитела к C5.

На фиг. 5А - результаты анализа методом вестерн-блоттинга связывания полученных из MG1-MG2-домена пептидных фрагментов (аминокислоты 33-124, 45-124, 52-124, 33-111, 33-108 и 45-111 SEQ ID

NO: 40), слитых с GST-меткой, как описано в примере 4.4. Антитело к GST использовали в качестве антигена, применяемого в реакции. Положения слитых с GST C5-фрагментов (35-37 кДа) указаны стрелкой.

На фиг. 5Б - результаты анализа методом вестерн-блоттинга связывания полученных из MG1-MG2-домена пептидных фрагментов (аминокислоты 33-124, 45-124, 52-124, 33-111, 33-108 и 45-111 SEQ ID NO: 40), слитых с GST-меткой, как описано в примере 4.4. Антитело CFA0305 использовали в качестве антитела, применяемого в реакции.

На фиг. 5В - обобщение результатов реакций связывания антител к C5, с полученными из бета-цепи C5 фрагментами, как описано в примере 4.4. Фрагменты, с которыми связывались антитела к C5, входящие в группу эпитопа В (CFA0305, CFA0307, CFA0366, CFA0501, CFA0538, CFA0599, CFA0666, CFA0672 и CFA0675), выделены серым цветом, а фрагменты, с которыми они не связывались, обозначены белым цветом.

На фиг. 6 - результаты анализа методом вестерн-блоттинга связывания содержащих точечные мутации мутантов C5, в которых E48, D51 и K109 в бета-цепи заменены на аланин (E48A, D51A и K109A соответственно), как описано в примере 4.5. На левой панели: экулизумаб (антитело к C5, связывающий альфа-цепь агент) использовали в качестве антитела, применяемого в реакции, положение альфа-цепи C5 (примерно 113 кДа) указано стрелкой. На правой панели: CFA0305 (антитело, входящее в группу эпитопа В, агент, связывающий бета-цепь) использовали в качестве антитела, применяемого в реакции, положение бета-цепи C5 (примерно 74 кДа) обозначено наконечником стрелки.

На фиг. 7 - полученные методом BIACORE® сенсограммы, на которых продемонстрировано взаимодействие экулизумаба-F760G4 (верхняя панель) или 305LO5 (нижняя панель) с мутантами C5 как описано в примере 4.6. Сенсограммы получали путем инъекции C5-wt (жирная сплошная кривая), C5-E48A (кривая из коротких штрихов), C5-D51A (кривая из длинных штрихов) и C5-K109A (тонкая сплошная кривая) соответственно на поверхность сенсора, на которой иммобилизован экулизумаб-F760G4 или 305LO5. Экулизумаб представляет собой контрольное антитело к C5. 305LO5 представляет собой гуманизированное антитело CFA0305 (входящее в группу эпитопа С) как описано в примере 2.3.

На фиг. 8 - полученные методом BIACORE® сенсограммы, на которых продемонстрировано взаимодействие 305LO5 с мутантами C5-His для оценки зависимости от pH как описано в примере 4.7. Сенсограммы получали путем инъекции C5-wt (жирная сплошная кривая), C5-H70Y (кривая из длинных штрихов), C5-H72Y (кривая из коротких штрихов), C5-H110Y (пунктирная кривая) и C5-H70Y+H110Y (тонкая сплошная кривая) соответственно на поверхность сенсора, на которой иммобилизовано 305LO5. Комплексам антитело/антиген давали диссоциировать при pH 7,4, а затем дополнительно диссоциировать при pH 5,8 (указано стрелкой) для оценки pH-зависимых взаимодействий.

На фиг. 9А - данные, демонстрирующие ингибирование активируемого комплементом лизиса липосом антителами к C5, как описано в примере 5.1. Представлены результаты для CFA0305, CFA0307, CFA0366, CFA0501, CFA0538, CFA0599, CFA0666, CFA0672 и CFA0675, входящих в группу эпитопа В, как описано в примере 2.2.

На фиг. 9Б - данные, демонстрирующие ингибирование активируемого комплементом лизиса липосом антителами к C5, как описано в примере 5.1. Представлены результаты для антител CFA0330 и CFA0341, входящих в группу эпитопа В, как описано в примере 2.2.

На фиг. 10А - данные, демонстрирующие ингибирование образования C5a антителами к C5, как описано в примере 5.2. Концентрации C5a количественно оценивали в супернатантах, полученных при анализе лизиса липосом, результаты которого проиллюстрированы на фиг. 9А.

На фиг. 10Б - данные, демонстрирующие ингибирование образования C5a антителами к C5, как описано в примере 5.2. Концентрации C5a количественно оценивали в супернатантах, полученных при анализе лизиса липосом, результаты которого проиллюстрированы на фиг. 9Б.

На фиг. 11 - данные, демонстрирующие ингибирование активируемого комплементом гемолиза антителами к C5, как описано в примере 5.3. Активация комплемента происходила классическим путем.

На фиг. 12 - данные, демонстрирующие ингибирование активируемого комплементом гемолиза антителами к C5, как описано в примере 5.4. Активация комплемента происходила альтернативным путем.

На фиг. 13 - данные, демонстрирующие ингибирование активируемого комплементом лизиса липосом антителами к C5, как описано в примере 8.1. Представлены результаты для антител 305LO15-SG422, 305LO16-SG422, 305LO18-SG422, 305LO19-SG422, 305LO20-SG422 и 305LO20-SG115.

На фиг. 14 - данные, демонстрирующие ингибирование активируемого комплементом лизиса липосом антителами к C5, как описано в примере 8.1. Представлены результаты для антител 305LO15-SG115 и 305LO23-SG429.

На фиг. 15 - данные, демонстрирующие ингибирование активируемого комплементом лизиса липосом антителами к C5, как описано в примере 8.1. Представлены результаты для антител 305LO22-SG115, 305LO22-SG422, 305LO23-SG115 и 305LO23-SG422.

На фиг. 16 - данные, демонстрирующие ингибирование образования C5a антителами к C5, как описано в примере 8.2. Концентрации C5a количественно оценивали в супернатантах, полученных при анализе лизиса липосом, результаты которого проиллюстрированы на фиг. 13.

На фиг. 17 - данные, демонстрирующие ингибирование образования C5a антителами к C5, как описано в примере 8.2. Концентрации C5a количественно оценивали в супернатантах, полученных при анализе лизиса липосом, результаты которого проиллюстрированы на фиг. 14.

На фиг. 18 - данные, демонстрирующие ингибирование активности комплемента в плазме обезьян антителами к C5, как описано в примере 8.3. Антитела к C5 вводили обезьянам циномогус и измеряли активность комплемента в плазме обезьян путем анализа гемолиза.

На фиг. 19 - данные, демонстрирующие ингибирование биологической активности C5 дикого типа (WT) и вариантов C5 (V145I, R449G, V802I, R885H, R928Q, D966Y, S1310N и E1437D) антителом к C5 (экулизумаб), как описано в примере 8.4.

На фиг. 20 - данные, демонстрирующие ингибирование биологической активности C5 дикого типа (WT) и вариантов C5 (V145I, R449G, V802I, R885H, R928Q, D966Y, S1310N и E1437D) антителом к C5 (вариант 305), как описано в примере 8.4.

На фиг. 21 - данные, демонстрирующие ингибирование активируемого комплементом лизиса липосом антителами к C5 (BNJ441 и вариант 305), как описано в примере 8.5.

На фиг. 22 - изображение кристаллической структуры 305 Fab, связанного с MG1-доменом человеческого C5 (hC5), которая описана в примере 9.6. На фиг. 22А представлено изображение асимметричной элементарной ячейки. MG1 изображен в виде поверхности, а 305 Fab изображен с помощью полосок (темно-серый цвет: тяжелая цепь, светло-серый цвет: легкая цепь). На фиг. 22Б представлено наложение молекул 1 и 2 (темно-серый цвет: молекула 1, светлосерый цвет: молекула 2).

На фиг. 23А - данные об эпитопе в контактной области 305 Fab в MG1-домене, описанные в примере 9.6. На фиг. 23А представлены данные о картировании MG1 в аминокислотной последовательности (темно-серый цвет: расстояние меньше чем 3,0 Å, светло-серый цвет: расстояние меньше чем 4,5 Å).

На фиг. 23Б - данные об эпитопе в контактной области 305 Fab в MG1-домене, описанные в примере 9.6. На фиг. 23Б представлены данные о картировании в кристаллической структуре (темно-серые сферы: расстояние меньше чем 3,0 Å, светло-серые сферы: расстояние меньше чем 4,5 Å).

На фиг. 24А - укрупненное изображение, иллюстрирующее взаимодействия E48, D51 и K109 (изображены палочками) с 305 Fab (изображен в виде поверхности), что описано в примере 9.7.

На фиг. 24Б - иллюстрация взаимодействий между E48 и его окружением (темно-серая пунктирная линия: водородная связь с Fab, светло-серая пунктирная линия: опосредуемая водой водородная связь), что описано в примере 9.7.

На фиг. 24В - иллюстрация взаимодействий между D51 и его окружением (темно-серая пунктирная линия: водородная связь с Fab), что описано в примере 9.7.

На фиг. 24Г - иллюстрация взаимодействий между K109 и его окружением (темно-серая пунктирная линия: водородная связь с Fab, светло-серая пунктирная линия: соляная мостиковая связь с H-CDR3_D95), что описано в примере 9.7.

На фиг. 25А - укрупненное изображение, иллюстрирующее взаимодействия H70, H72 и H110 (изображены палочками) с 305 Fab (изображен в виде поверхности), которые описаны в примере 9.8, в той же самой ориентации, что и на фиг. 24А.

На фиг. 25Б - иллюстрация взаимодействий между H70 и его окружением, что описано в примере 9.8. Этот гистидиновый остаток изображен с помощью палочек и сетки. Водородная связь изображена пунктирной линией.

На фиг. 25В - иллюстрация взаимодействий между H72 и его окружением, что описано в примере 9.8. Этот гистидиновый остаток изображен с помощью палочек и сетки. Водородная связь изображена пунктирной линией.

На фиг. 25Г - иллюстрация взаимодействий между H110 и его окружением, что описано в примере 9.8. Этот гистидиновый остаток изображен с помощью палочек и сетки. Расстояние между H110 и H-CDR3_H100c указано пунктирной линией.

Описание вариантов осуществления изобретения

Технологии и процедуры, которые описаны или на которые сделаны ссылки в настоящем описании, в целом хорошо известны специалистам в данной области, и их широко применяют с использованием общепринятых методологий, таких, например, как описанные у Sambrook и др., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3-е изд., изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; *Current Protocols in Molecular Biology* (под ред. F.M. Ausubel и др., 2003); серии *Methods in Enzymology* (изд-во Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (под ред. M.J. MacPherson, B.D. Hames и G.R. Taylor, 1995), *Antibodies, A Laboratory Manual*, под ред. Harlow и Lane, 1988 и *Animal Cell Culture* (под ред. R.I. Freshney 1987); *Oligonucleotide Synthesis* (под ред. M.J. Gait, 1984); *Methods in Molecular Biology*, изд-во Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (под ред. J.E. Cellis, 1998) из-во Academic Press; *Animal Cell Culture* (под ред. R.I. Freshney, 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather и P.E. Roberts, 1998), изд-во Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (под ред. A. Doyle, J.B. Griffiths и D.G. Newell, 1993-8), изд-во J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (под ред. D.M. Weir и C.C. Blackwell); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (под ред. J.M. Miller и M.P. Calos, 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (под ред. Mullis и др., 1994); *Current Protocols in Immunology*

(под ред. J.E. Coligan и др., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (изд-во Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway и P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (под ред. D. Catty., изд-во IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (под ред. P. Shepherd и C. Dean, изд-во Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow и D. Lane, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (под ред. M. Zanetti и J. D. Capra, изд-во Harwood Academic Publishers, 1995); и Cancer: Principles and Practice of Oncology (под ред. V.T. DeVita и др., изд-во J.B. Lippincott Company, 1993).

I. Определения

Если не указано иное, то технические и научные понятия, применяемые в настоящем описании, имеют значения, хорошо известные обычному специалисту в области, в которой относится настоящее изобретение. У Singleton и др., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2-ое изд., изд-во J. Wiley & Sons, New York, N.Y. 1994 и March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4-ое изд., изд-во John Wiley & Sons, New York, N.Y. 1992, в целом представлено предназначенное для специалистов в данной области толкование многих понятий, применяемых в настоящей заявке. Все процитированные в настоящем описании ссылки, включая заявки на патент и публикации патентов, полностью включены в него в качестве ссылки.

Для интерпретации настоящего описания изобретения следует применять приведенные ниже понятия, и, когда это возможно, понятия, применяемые в единственном числе, включают также их применение во множественном числе и наоборот. Должно быть очевидно, что применяемая в настоящем описании терминология представлена только для цели описания конкретных вариантов осуществления изобретения и не направлена на ограничение его объема. В случае, если любое указанное ниже определение вступает в противоречие с указанным в любом документе, включенном в описание в качестве ссылки, то следует использовать указанное ниже определение.

Для целей настоящего описания "акцепторный человеческий каркасный участок" означает каркасный участок, который содержит аминокислотную последовательность каркасного участка варибельного домена легкой цепи (VL) или каркасный участок варибельного домена тяжелой цепи (VH), происходящую из каркасного участка человеческого иммуноглобулина или человеческого консенсусного каркасного участка, указанного ниже. Акцепторный человеческий каркасный участок, "происходящий из" каркасного участка человеческого иммуноглобулина или человеческого консенсусного каркасного участка, может иметь такую же аминокислотную последовательность или может содержать изменения в аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения количество аминокислотных изменений составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее или 2 или менее. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность человеческого акцепторного каркасного участка VL идентична последовательности каркасного участка VL человеческого иммуноглобулина или последовательности человеческого консенсусного каркасного участка.

Понятие "аффинность" относится к суммарной силе всех нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). В контексте настоящего описания, если не указано иное, "аффинность связывания" относится к присущей молекуле аффинности связывания, отражающей взаимодействие по типу 1:1 между компонентами связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y, как правило, можно характеризовать с помощью константы диссоциации (Kd). Аффинность можно оценивать с помощью общепринятых методов, известных в данной области, включая те, которые представлены в настоящем описании. Ниже в качестве иллюстрации представлены конкретные варианты измерения аффинности связывания.

Антитело "с созревшей аффинностью" обозначает антитело с одним или несколькими изменениями в одном или нескольких гиперварибельных участках (HVR) по сравнению с родительским антителом, которое не содержит указанных изменений, указанные изменения приводят к повышению аффинности антитела к антигену.

Понятия "антитело к C5" и "антитело, которое связывается с C5" относятся к антителу, которое обладает способностью связываться с C5 с аффинностью, достаточной для того, чтобы антитело можно было применять в качестве диагностического и/или терапевтического агента, мишенью которого является C5. В одном из вариантов осуществления изобретения уровень связывания антитела к C5 с неродственным не представляющим собой C5 белком составляет менее чем примерно 10% от связывания антитела с C5 по данным измерений, полученным, например, с помощью радиоиммуноанализа (РИА). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, которое связывается с C5, имеет константу диссоциации (Kd) 1 мкМ или менее, 100 нМ или менее, 10 нМ или менее, 1 нМ или менее, 0,1 нМ или менее, 0,01 нМ или менее или 0,001 нМ или менее (например, 10^{-8} М или менее, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к C5 связывается с эпитопом C5, который является консервативным для C5 из различных видов.

В контексте настоящего описания понятие "антитело" используется в его наиболее широком смысле и относится к различным структурам антител, включая (но, не ограничиваясь только ими) монокло-

нальные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они обладают требуемой антигенсвязывающей активностью.

Понятие "фрагмент антитела" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, связывающуюся с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антитела включают (но, не ограничиваясь только ими) Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; димерные антитела (диабоды); линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv) и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Понятие "антитело, которое связывается с тем же эпитопом", что и референс-антитело, относится к антителу, которое блокирует связывание референс-антитела с его антигеном при оценке с помощью анализа в условиях конкуренции (конкурентный анализ) и/или, наоборот, референс-антитело блокирует связывание антитела с его антигеном при оценке с помощью конкурентного анализа. Пример конкурентного анализа представлен в настоящем описании.

Понятие "химерное" антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи происходит из конкретного источника или конкретных видов, а остальная часть тяжелой и/или легкой цепи происходит из другого источника или других видов.

Понятие "класс" антитела относится к типу константного домена или константной области, который/которая входит в его тяжелую цепь. Известно пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM и некоторые из них можно подразделять дополнительно на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулина, обозначают как альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю (α , δ , ϵ , γ и μ) соответственно.

Понятие "цитотоксический агент" в контексте настоящего описания относится к субстанции, которая ингибирует клеточную функцию или препятствует ей и/или вызывает клеточную гибель или деструкцию. Цитотоксические агенты включают (но, не ограничиваясь только ими) радиоактивные изотопы (например, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² и радиоактивные изотопы Lu); химиотерапевтические агенты или лекарственные средства (например, метотрексат, адриамицин, алкалоиды барвинка (винкристин, винбластин, эпопозид), доксорубицин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, даунорубицин или другие интеркалирующие агенты); ингибирующие рост агенты; ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты; антибиотики; токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибного, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты; и различные противоопухолевые или противооконые агенты, указанные ниже.

Понятие "эффекторная функция" относится к тем видам биологической активности, которые связаны с Fc-областью антитела, которые варьируются в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (CDC); связывание Fc-рецептора; антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора) и активацию В-клеток.

Понятие "эффективное количество" агента, например, фармацевтической композиции, означает количество, эффективное в дозах и в течение периода времени, необходимых для достижения требуемого терапевтического или профилактического результата.

Понятие "эпитоп" включает любую детерминанту, обладающую способностью связываться антителом. Эпитоп представляет собой область антигена, которая связывается с антителом, мишенью которого является антиген, и включает специфические аминокислоты, которые непосредственно контактируют с антителом. Эпитопные детерминанты могут включать химически активные поверхностные группы молекул, таких как аминокислоты, боковые сахарные цепи, фосфорильные или сульфонильные группы, и могут иметь специфические характеристики трехмерной структуры и/или специфические характеристики зарядов. Как правило, антитела, специфические в отношении конкретного антигена-мишени, должны предпочтительно распознавать эпитоп на антигене-мишени в сложной смеси белков и/или макромолекул.

Понятие "Fc-область" в контексте настоящего описания относится к C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Понятие включает нативную последовательность Fc-областей и вариант Fc-областей. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG простирается с Cys226 или с Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако C-концевой лизин (Lys447) Fc-области может присутствовать или отсутствовать. Если специально не указано иное, то нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константной области соответствует системе нумерации EU, которую обозначают также как EU-индекс, описанной у Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Понятие "каркасный участок" или "FR", означает остатки варибельного домена, отличные от остатков гиперварибельного участка (HVR). FR варибельного домена, как правило, состоит из четырех FR-доменов: FR1, FR2, FR3 и FR4. Таким образом, последовательности HVR и FR, как правило, имеют

следующее расположение в VH (или VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Понятия "полноразмерное антитело", "интактное антитело" и "цельное антитело" в контексте настоящего описания используют взаимозаменяемо для обозначения антитела, имеющего структуру, практически сходную с нативной структурой антитела, или имеющего тяжелые цепи, которые содержат представленную в настоящем описании Fc-область.

Понятия "клетка-хозяин", "линия клеток-хозяев" и "культура клеток-хозяев" используют взаимозаменяемо, и они относятся к клеткам, в которые интродуцирована экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство указанных клеток. К клеткам-хозяевам относятся "трансформанты" и "трансформированные клетки", которые включают первично трансформированную клетку и полученное из нее потомство безотносительно к количеству пересевов. Потомство может не быть полностью идентичным по составу нуклеиновых кислот родительской клетке, но может содержать мутации. Под объем изобретения подпадает мутантное потомство, которое обладает такой же функцией или биологической активностью, которая обнаружена в результате скрининга или отобрана у исходной трансформированной клетки.

"Человеческое антитело" представляет собой антитело, имеющее аминокислотную последовательность, которая соответствует последовательности антитела, продуцируемого в организме человека или человеческими клетками, или происходящее из нечеловеческого источника, в котором использован спектр человеческих антител или другие кодирующие человеческое антитело последовательности. Из указанного определения человеческого антитела специально исключено гуманизованное антитело, содержащее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки.

"Человеческий консенсусный каркасный участок" представляет собой каркасный участок, в который входят наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в выбранных последовательностях каркасных участков VL или VH человеческого иммуноглобулина. Как правило, выбор последовательностей VL или VH человеческого иммуноглобулина осуществляют из подгруппы последовательностей вариабельных доменов. Как правило, подгруппа последовательностей представляет собой подгруппу, описанную у Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., публикация NIH 91-3242, Bethesda MD, тт. 1-3, 1991. В одном из вариантов осуществления изобретения касательно VL подгруппа представляет собой подгруппу каппа I согласно Kabat и др., выше. В одном из вариантов осуществления изобретения касательно VH подгруппа представляет собой подгруппу III согласно Kabat и др., выше.

Понятие "гуманизованное" антитело относится к химерному антителу, которое содержит аминокислотные остатки из нечеловеческих HVR и аминокислотные остатки из человеческих FR. В некоторых вариантах осуществления изобретения гуманизованное антитело может содержать практически все из по меньшей мере одного и, как правило, двух вариабельных доменов, в которых все или практически все HVR (например, CDR) соответствуют участкам нечеловеческого антитела, а все или практически все FR соответствуют участкам человеческого антитела. Гуманизованное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, происходящей из человеческого антитела. Понятие "гуманизованная форма" антитела, например, нечеловеческого антитела, относится к антителу, которое подвергли гуманизации.

Понятие "гипервариабельный участок" или "HVR" в контексте настоящего описания относится к каждому из участков вариабельного домена антитела, последовательности которых являются гипервариабельными ("определяющие комплементарность участки" или "CDR") и/или формируют петли определенной структуры ("гипервариабельные петли"), и/или содержат контактирующие с антигеном остатки ("контакты с антигеном"). Как правило, антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). Согласно настоящему описанию примеры HVR включают (а) гипервариабельные петли, включающие аминокислотные остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) (Chothia и Lesk, *J. Mol. Biol.* 196, 1987, сс. 901-917); (б) CDR, включающие аминокислотные остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) (Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, публикация NIH 91-3242); (в) области контакта с антигеном, включающие аминокислотные остатки 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) и 93-101 (H3) (MacCallum и др., *J. Mol. Biol.* 262, 1996, сс. 732-745); и (г) комбинации остатков, указанных в подпунктах (а), (б) и/или (в), включающие аминокислотные остатки HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) и 94-102 (H3).

Если специально не указано иное, то остатки в HVR и другие остатки в вариабельном домене (например, остатки в FR) нумеруют согласно Kabat и др., выше.

"Иммуноконъюгат" представляет собой антитело, конъюгированное с одной или несколькими гетерологичной(ми) молекулой(ми), включая (но, не ограничиваясь только им) цитотоксический агент.

"Индивидуум" или "субъект" представляет собой млекопитающее. К млекопитающим относятся (но, не ограничиваясь только ими) одомашненные животные (например, коровы, овцы, кошки, собаки и лошади), приматы (например, человек и приматы кроме человека, например, обезьяны), кролики и грызуны (например, мыши и крысы). В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуум или субъект представляет собой человека.

"Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое отделено от компонента его естест-

венного окружения. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело очищают до чистоты, превышающей 95% или 99% по данным, например, электрофоретических анализов (таких, например, как ДСН-ПААГ, изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ), капиллярный электрофорез) или хроматографических анализов (таких, например, как ионообменная хроматография или ЖХВР с обращенной фазой). Обзор методов оценки чистоты антител см., например, у Flatman и др., J. Chrom. B 848, 2007, сс. 79-87.

"Выделенная" нуклеиновая кислота представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая отделена от компонента ее естественного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетке, которая в норме включает молекулу нуклеиновой кислоты, но в которой молекула нуклеиновой кислоты присутствует вне хромосомы или в которой ее локализация на хромосоме отличается от ее встречающейся в естественных условиях локализации на хромосоме.

Понятие "выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к C5" относится к одной или нескольким молекулам нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелые и легкие цепи антитела (или их фрагменты), включая указанную(е) молекулу(ы) в одном векторе или в различных векторах, и указанную(е) молекулу(ы) нуклеиновой(ых) кислоты (кислот), присутствующую(е) в одном или нескольких положениях в клетке-хозяине.

Понятие "моноклональное антитело" в контексте настоящего описания относится к антителу, полученному из популяции практически гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, входящие в популяцию, идентичны и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением возможных вариантов антител, например, содержащих мутации, встречающиеся в естественных условиях или возникающие в процессе производства препарата моноклонального антитела, указанные варианты, как правило, присутствуют в минорных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые, как правило, включают различные антитела к различным детерминантам (эпитопам), каждое моноклональное антитело из препарата моноклонального антитела направлено против одной детерминанты антигена. Таким образом, прилагательное "моноклональный" определяет особенность антитела, характеризуя его как полученное из практически гомогенной популяции антител, а не сконструированное в соответствии с требованиями к получению антитела с помощью какого-либо конкретного метода. Например, моноклональные антитела, которые можно применять согласно настоящему изобретению, можно создавать с помощью различных технологий, включая (но, не ограничиваясь только ими) метод гибридом, методы рекомбинантной ДНК, методы фагового дисплея и методы, основанные на использовании трансгенных животных, которые содержат все или часть локусов человеческого иммуноглобулина, указанные методы и другие, приведенные в качестве примера методы получения моноклональных антител представлены в настоящем описании.

Понятие "голое антитело" относится к антителу, неконъюгированному с гетерологичным фрагментом (например, цитотоксическим фрагментом) или радиоактивной меткой. Голое антитело может присутствовать в фармацевтической композиции.

Понятие "нативные антитела" относится к встречающимся в естественных условиях молекулам иммуноглобулинов с различными структурами. Например, нативные антитела в виде IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой примерно 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей, связанных дисульфидными мостиками. В направлении от N-конца к C-концу, каждая тяжелая цепь имеет вариабельную область (VH), которую называют также вариабельным тяжелым доменом или вариабельным доменом тяжелой цепи, за которой следует три константных домена (CH1, CH2 и CH3). Аналогично этому в направлении от N-конца к C-концу, каждая легкая цепь имеет вариабельную область (VL), которую называют также вариабельным легким доменом или вариабельным доменом легкой цепи, за которой следует константный домен легкой цепи (CL). Легкая цепь антитела в зависимости от аминокислотной последовательности ее константного домена может принадлежать к одному из двух типов, которые обозначают каппа (κ) и лямбда (λ).

Понятие "листовка-вкладыш в упаковку" относится к инструкциям, которые обычно входят в поступающие в продажу упаковки терапевтических продуктов, содержащим информацию о показаниях, применении, дозе, пути введения, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или мерах предосторожности, которые связаны с применением указанных терапевтических продуктов.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" относительно полипептидной референс-последовательности определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в полипептидной референс-последовательности, после выравнивания последовательностей и при необходимости интродукции брешей для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и не рассматривая какие-либо консервативные замены в качестве компонента при оценке идентичности последовательностей. Сравнительный анализ для целей определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно осуществлять различными путями, известными в данной области, используя, например, публично доступные компьютерные программы, такие как программа BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определять соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения мак-

симального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

Однако для целей настоящего изобретения величины % идентичности аминокислотных последовательностей получают, используя компьютерную программу для сравнения последовательностей ALIGN-2. Авторство компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2 принадлежит фирме Genentech, Inc., и исходный код был представлен в комплекте с документацией для пользователей в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован как U.S. Copyright Registration № TXU510087. Программа ALIGN-2 публично доступна от фирмы Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, шт. Калифорния, или ее можно компилировать на основе исходного кода. Программу ALIGN-2 можно компилировать для применения в операционной системе UNIX, включая цифровую систему UNIX V4.0D. Все параметры, требуемые для сравнения последовательностей, устанавливаются программой ALIGN-2 и не должны изменяться. В ситуациях, в которых ALIGN-2 применяют для сравнения аминокислотных последовательностей, % идентичности аминокислотных последовательностей данной аминокислотной последовательности А по сравнению, с или относительно данной аминокислотной последовательности Б (что в альтернативном варианте можно обозначать как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или содержит определенный % идентичности аминокислотной последовательности по сравнению, с или относительно данной аминокислотной последовательности Б), рассчитывают следующим образом: $100 \times \text{дробь } X/Y$, где X обозначает количество аминокислотных остатков, определенных как идентичные совпадения при оценке с помощью программы для сравнительного анализа последовательностей ALIGN-2, где с помощью программы осуществляли сравнение А и Б, и где Y обозначает общее количество аминокислотных остатков в Б. Должно быть очевидно, что, если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности Б, то % идентичности аминокислотных последовательностей А относительно Б не может быть равен % идентичности аминокислотной последовательности Б относительно А. Если специально не указано иное, то все величины % идентичности аминокислотных последовательностей, указанные в настоящем описании, получали с использованием описанной в предыдущем параграфе компьютерной программы ALIGN-2.

Понятие "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой форме, что он обеспечивает биологическую активность входящего в его состав действующего вещества, которое должно обладать эффективностью, и который не содержит дополнительных компонентов, обладающих неприемлемой токсичностью для индивидуума, которому следует вводить композицию.

"Фармацевтически приемлемый носитель" относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, отличному от действующего вещества, который является нетоксичным для индивидуума. Фармацевтически приемлемые носители включают (но, не ограничиваясь только ими) буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

Понятие "C5" в контексте настоящего описания может относиться к любому нативному C5 из любого позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, человек и обезьяны) и грызуны (например, мыши и крысы). Если специально не указано иное, понятие "C5" относится к человеческому белку C5, имеющему аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39, и содержащему последовательность бета-цепи, представленную в SEQ ID NO: 40. Понятие относится к "полноразмерному" непроцессированному C5, а также к любой форме C5, которая образуется в результате процессинга в клетке. Под понятие подпадают также встречающиеся в естественных условиях варианты C5, например, сплайсинговые варианты или аллельные варианты. Аминокислотную последовательность приведенного в качестве примера человеческого C5 представлена в SEQ ID NO: 39 (C5 "дикого типа" или "WT"). Аминокислотная последовательность приведенной в качестве примера бета-цепи человеческого C5 представлена в SEQ ID NO: 40. Аминокислотные последовательности приведенных в качестве примера MG1-, MG2- и MG1-MG2-доменов бета-цепи человеческого C5 представлены в SEQ ID NO: 41, 42 и 43 соответственно. Аминокислотные последовательности приведенных в качестве примера C5 обезьян циномогус и мышей представлены в SEQ ID NO: 44 и 105 соответственно. Аминокислотные остатки 1-19 SEQ ID NO: 39, 40, 43, 44 и 105 соответствуют сигнальной последовательности, которая удаляется в результате процессинга в клетке, и поэтому отсутствуют в соответствующих приведенных в качестве примера аминокислотных последовательностях.

В контексте настоящего описания понятие "лечение" (и его грамматические вариации, такие как "лечить" или "процесс лечения") относится к клиническому вмешательству с целью изменения естественного течения болезни у индивидуума, подлежащего лечению, и его можно осуществлять либо для профилактики, либо в процессе развития клинической патологии. Требуемыми действиями лечения являются (но, не ограничиваясь только ими) предупреждение возникновения или рецидива болезни, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий болезни, предупреждение метастазов, снижение скорости развития болезни, облегчение или временное ослабление болезненного состояния и ремиссия или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, применяют для задержки развития болезни или замедления прогрессирования болезни.

Понятие "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяже-

лой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) нативного антитела, как правило, имеют сходные структуры, при этом каждый домен содержит четыре консервативных каркасных участка (FR) и три гипервариабельных участка (HVR) (см., например, Kindt и др., *Kuby Immunology*, 6-ое изд., изд-во W.H. Freeman and Co., 2007, с. 91). Одного VH- или VL-домена может быть достаточно для обеспечения специфичности связывания антигена. Кроме того, антитела, которые связываются с конкретным антигеном, можно выделять, используя VH- или VL-домен из антитела, которое связывается с антигеном, для скрининга библиотеки комплементарных VL- или VH-доменов соответственно (см., например, Portolano и др., *J. Immunol.* 150, 1993, сс. 880-887; Clarkson и др., *Nature* 352, 1991, сс. 624-628).

Понятие "вектор" в контексте настоящего описания относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая обладает способностью к размножению другой нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Понятие включает вектор в виде самореплицирующейся структуры нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он интродуцирован. Некоторые векторы обладают способностью контролировать экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Указанные векторы в контексте настоящего описания обозначают как "экспрессионные векторы".

II. Композиции и способы

Одним из объектов изобретения являются, в частности, антитела к C5 и их применения. Некоторыми вариантами осуществления изобретения являются антитела, которые связываются с C5. Антитела, предлагаемые в изобретении, можно применять, например, для диагностирования или лечения заболевания.

A. Примеры антител к C5

Одним из объектов изобретения являются выделенные антитела, которые связываются с C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, связывается с эпитопом в бета-цепи C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к C5 связывается с эпитопом в MG1-MG2-домене бета-цепи C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к C5 связывается с эпитопом во фрагменте, состоящем из аминокислот 19-180 бета-цепи C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к C5 связывается с эпитопом в MG1-домене (аминокислоты 20-124 SEQ ID NO: 40 (SEQ ID NO: 41)) бета-цепи C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к C5 связывается с эпитопом во фрагменте, состоящем из аминокислот 33-124 бета-цепи C5 (SEQ ID NO: 40). В другом варианте осуществления изобретения антитело не связывается с фрагментом, более коротким, чем фрагмент, состоящий из аминокислот 33-124 бета-цепи C5, например, с фрагментом, состоящим из аминокислот 45-124, 52-124, 33-111, 33-108 или 45-111 бета-цепи C5 (SEQ ID NO: 40).

Другим объектом изобретения являются антитела к C5, обладающие pH-зависимыми характеристиками связывания. В контексте настоящего описания понятие "pH-зависимое связывание" означает, что антитело обладает "пониженной способностью связываться с C5 при кислом pH по сравнению с его связыванием при нейтральном pH" (для целей настоящего описания оба понятия можно использовать взаимозаменяемо). Например, антитела с "с pH-зависимыми характеристиками связывания" включают антитела, которые связываются с C5 с более высокой аффинностью при нейтральном pH, чем при кислом pH. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, связываются с C5 с аффинностью, по меньшей мере в 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 или более раз более высокой при нейтральном pH, чем при кислом pH. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела связываются с C5 с более высокой аффинностью при pH 7,4, чем при pH 5,8. В других вариантах осуществления изобретения антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, связываются с C5 с аффинностью, по меньшей мере в 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 или более раз более высокой при pH 7,4, чем при pH 5,8.

Для целей настоящего описания "аффинность" антитела к C5 выражают в понятиях KD антитела. KD антитела означает константу равновесия диссоциации взаимодействия антитело-антиген. Чем выше величина KD, характеризующая связывание антитела с его антигеном, тем слабее его аффинность связывания с указанным конкретным антигеном. Таким образом, в контексте настоящего описания понятие "более высокая аффинность при нейтральном pH, чем при кислом pH" (или эквивалентное понятие "pH-зависимое связывание") означает, что KD, характеризующая связывание антитела с C5 при кислом pH, выше, чем KD, характеризующая связывание антитела с C5 при нейтральном pH. Например, в контексте настоящего изобретения считается, что антитело связывается с C5 с более высокой аффинностью при нейтральном pH, чем при кислом pH, если KD, характеризующая связывание антитела с C5 при кислом pH, по меньшей мере в 2 раза выше, чем KD, характеризующая связывание антитела с C5 при нейтральном pH. Таким образом, настоящее изобретение включает антитела, связывание которых с C5 при кислом pH характеризуется величиной KD, которая по меньшей мере в 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 или более раз превышает KD, характеризующую связывание с C5 при нейтральном pH. В другом варианте осуществления изобретения величина KD антитела при нейтральном pH может составлять 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} М или менее. В другом варианте осуществления изобретения величина KD антитела при кислом pH может составлять 10^{-9} М, 10^{-8} М, 10^{-7} М, 10^{-6} М или более.

В других вариантах осуществления изобретения считается, что антитело связывается с C5 с более высокой аффинностью при нейтральном pH, чем при кислом pH, если величина KD, характеризующая связывание антитела с C5 при pH 5,8, по меньшей мере в 2 раза выше, чем KD, характеризующая связывание антитела с C5 при pH 7,4. В некоторых вариантах осуществления изобретения связывание предложенных антител с C5 при pH 5,8 характеризуется величиной KD, которая по меньшей мере в 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 или более раз превышает KD, характеризующую связывание антитела с C5 при pH 7,4. В другом варианте осуществления изобретения величина KD антитела при pH 7,4 может составлять 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} М или менее. В другом варианте осуществления изобретения величина KD антитела при pH 5,8 может составлять 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} М или более.

Характеристики связывания антитела с конкретным антигеном можно выражать также в виде kd антитела. Величина kd антитела означает константу скорости диссоциации антитела относительно конкретного антигена и ее выражают в виде величин, обратных секунде (т.е. с^{-1}). Повышенная величина kd означает более слабое связывание антитела с его антигеном. Таким образом, настоящее изобретение включает антитела, связывание которых с C5 характеризуется более высокой величиной kd при кислом pH, чем при нейтральном pH. Настоящее изобретение включает антитела, связывание которых с C5 при кислом pH характеризуется величиной kd, которая по меньшей мере в 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 или более раз превышает kd, характеризующую связывание антитела с C5 при нейтральном pH. В другом варианте осуществления изобретения величина kd антитела при нейтральном pH может составлять 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 1/с или менее. В другом варианте осуществления изобретения величина kd антитела при кислом pH может составлять 10^3 , 10^2 , 10^1 1/с или более. Изобретение включает также антитела, связывание которых с C5 характеризуется более высокой величиной kd при pH 5,8, чем при pH 7,4. Изобретение включает антитела, связывание которых с C5 при pH 5,8 характеризуется величиной kd, которая по меньшей мере в 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 или более раз превышает kd, характеризующую связывание антитела с C5 при pH 7,4. В другом варианте осуществления изобретения величина kd антитела при pH 7,4 может составлять 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 1/с или менее. В другом варианте осуществления изобретения величина kd антитела при pH 5,8 может составлять 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} 1/с или более.

В некоторых случаях "пониженную способность связываться с C5 при кислом pH по сравнению со способностью связываться при нейтральном pH" выражают в виде соотношения величины KD, характеризующей связывание антитела с C5 при кислом pH, и величины KD, характеризующей связывание антитела с C5 при нейтральном pH (или наоборот). Например, антитело может рассматриваться как обладающее "пониженной способностью связываться с C5 при кислом pH по сравнению со способностью связываться при нейтральном pH" для целей настоящего изобретения, если для антитела соотношение KD при кислом/нейтральном pH составляет 2 или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение KD при pH 5,8/pH 7,4 для антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, составляет 2 или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение KD при кислом/нейтральном pH для антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, может составлять 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 или более. В другом варианте осуществления изобретения величина KD антитела при нейтральном pH может составлять 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} М или менее. В другом варианте осуществления изобретения величина KD антитела при кислом pH может составлять 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} М или более. В других случаях антитело может рассматриваться как обладающее "пониженной способностью связываться с C5 при кислом pH по сравнению со способностью связываться при нейтральном pH", если для антитела характерно соотношение KD при pH 5,8/pH 7,4, составляющее 2 или более. В некоторых приведенных в качестве примеров вариантах осуществления изобретения соотношение KD при pH 5,8/pH 7,4 для антитела может составлять 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 или более. В другом варианте осуществления изобретения величина KD антитела при pH 7,4 может составлять 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} М или менее. В другом варианте осуществления изобретения величина KD антитела при pH 5,8 может составлять 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} М или более.

В некоторых случаях "пониженную способность связываться с C5 при кислом pH по сравнению со способностью связываться при нейтральном pH" выражают в виде соотношения величины kd, характеризующей связывание антитела с C5 при кислом pH, и величины kd, характеризующей связывание антитела с C5 при нейтральном pH (или наоборот). Например, антитело может рассматриваться как обладающее "пониженной способностью связываться с C5 при кислом pH по сравнению со способностью связываться при нейтральном pH" для целей настоящего изобретения, если для антитела соотношение kd при кислом/нейтральном pH составляет 2 или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение kd при pH 5,8/pH 7,4 для антитела к C5, предлагаемого в настоящем изобретении, составляет 2 или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение kd при кислом/нейтральном pH для антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, может составлять 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 или более. В другом варианте осуществе-

ствления изобретения величина kd антитела при нейтральном pH может составлять 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 1/с или менее. В другом варианте осуществления изобретения величина kd антитела при кислом pH может составлять 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} 1/с или более. В некоторых приведенных в качестве примеров вариантах осуществления изобретения соотношение kd при pH 5,8/pH 7,4 для антитела может составлять 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 или более. В другом варианте осуществления изобретения величина kd антитела при pH 7,4 может составлять 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 1/с или менее. В другом варианте осуществления изобретения величина kd антитела при pH 5,8 может составлять 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} 1/с или более.

В контексте настоящего описания понятие "кислый pH" означает pH от 4,0 до 6,5. Понятие "кислый pH" включает одно из следующих значений pH 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 и 6,5. В конкретных объектах изобретения "кислый pH" соответствует 5,8.

В контексте настоящего описания понятие "нейтральный pH" означает pH от 6,7 до примерно 10,0. Понятие "нейтральный pH" включает одно из следующих значений pH 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, и 10,0. В конкретных объектах изобретения "нейтральный pH" соответствует 7,4.

Указанные в настоящем описании величины KD и kd можно определять с помощью биосенсора на основе метода поверхностного плазмонного резонанса для характеристики взаимодействий антитело-антиген (см., например, пример 7 в настоящем описании). Величины KD и величины kd можно определять при 25°C или 37°C.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, связывается с эпитопом в бета-цепи C5, который состоит из MG1-домена (SEQ ID NO: 41). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, связывается с эпитопом в бета-цепи (SEQ ID NO: 40) C5, который содержит по меньшей мере один фрагмент, выбранный из группы, которая состоит из аминокислот 47-57, 70-76 и 107-110. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, связывается с эпитопом во фрагменте бета-цепи (SEQ ID NO: 40) C5, который содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, которая состоит из Thr47, Glu48, Ala49, Phe50, Asp51, Ala52, Thr53, Lys57, His70, Val71, His72, Ser74, Glu76, Val107, Ser108, Lys109 и His110. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, связывается с эпитопом во фрагменте бета-цепи (SEQ ID NO: 40) C5, который содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, которая состоит из Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109 и His110. В некоторых вариантах осуществления изобретения связывание антитела к C5, предлагаемого в настоящем изобретении, с мутантом C5 снижено по сравнению с его связыванием с C5 дикого типа, где мутант C5 имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, которая состоит из Glu48, Asp51, His72 и Lys109. В другом варианте осуществления изобретения pH-зависимое связывание антитела к C5, предлагаемого в настоящем изобретении, с мутантом C5 снижено по сравнению с его pH-зависимым связыванием с C5 дикого типа, где мутант C5 имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, которая состоит из His70, His72 и His110. В следующем варианте осуществления изобретения в мутанте C5 аминокислота в положении, выбранном из Glu48, Asp51 и Lys109, заменена на аланин и аминокислота в положении, выбранном из His70, His72 и His110, заменена на тирозин.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, конкурирует за связывание с C5 с антителом, содержащим пару VH и VL, которая выбрана из: (а) VH, имеющей SEQ ID NO: 1, и VL, имеющей SEQ ID NO: 11; (б) VH, имеющей SEQ ID NO: 22, и VL, имеющей SEQ ID NO: 26; (в) VH, имеющей SEQ ID NO: 21, и VL, имеющей SEQ ID NO: 25; (г) VH, имеющей SEQ ID NO: 5, и VL, имеющей SEQ ID NO: 15; (д) VH, имеющей SEQ ID NO: 4, и VL, имеющей SEQ ID NO: 14; (е) VH, имеющей SEQ ID NO: 6, и VL, имеющей SEQ ID NO: 16; (ж) VH, имеющей SEQ ID NO: 2, и VL, имеющей SEQ ID NO: 12; (з) VH, имеющей SEQ ID NO: 3, и VL, имеющей SEQ ID NO: 13; (и) VH, имеющей SEQ ID NO: 9, и VL, имеющей SEQ ID NO: 19; (к) VH, имеющей SEQ ID NO: 7, и VL, имеющей SEQ ID NO: 17; (л) VH, имеющей SEQ ID NO: 8, и VL, имеющей SEQ ID NO: 18; (м) VH, имеющей SEQ ID NO: 23, и VL, имеющей SEQ ID NO: 27, и (н) VH, имеющей SEQ ID NO: 10, и VL, имеющей SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, связывается с C5 и контактирует с аминокислотой Asp51 (D51) SEQ ID NO: 39. В дополнительных вариантах осуществления изобретения антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, связывается с C5 и контактирует с аминокислотой Lys109 (K109) SEQ ID NO: 39. В следующем варианте осуществления изобретения антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, связывается с C5 и контактирует с аминокислотой Asp51 (D51) и аминокислотой Lys109 (K109) SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывание антитела к C5, предлагаемого в настоящем изобретении, с мутантом C5 снижено по сравнению с его связыванием с C5 дикого типа, где мутант C5 имеет замену Glu48Ala (E48A) в SEQ ID NO: 39. В другом варианте осуществления изобрете-

ния рН-зависимое связывание антитела к С5, предлагаемого в настоящем изобретении, с мутантом С5 снижено по сравнению с его рН-зависимым связыванием с С5 дикого типа, где мутант С5 имеет замену Glu48Ala (E48A) в SEQ ID NO: 39.

В следующем варианте осуществления изобретения антитело к С5 связывается с белком С5, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 39, но не связывается с белком С5, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 39 с заменой Н72У, где белок С5 и имеющий замену Н72У белок С5 получают и подвергают скринингу в одних и тех же условиях. В следующем варианте осуществления изобретения антитело к С5 связывается с белком С5, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 39, при рН 7,4, но не связывается с имеющим замену Н72У белком С5 при рН 7,4.

Не вдаваясь в какую-либо конкретную теорию, можно предположить, что связывание антитела к С5 с С5 снижается (или практически утрачивается), когда аминокислотный остаток на С5 заменяют на другую аминокислоту, это означает, что аминокислотный остаток на С5 имеет решающее значение для взаимодействия между антителом к С5 и С5 и что антитело может распознавать эпитоп в С5, внутри которого находится аминокислотный остаток.

При создании настоящего изобретения было обнаружено, что группа антител к С5, которые конкурируют друг с другом или связываются с одним и тем же эпитопом, может обладать рН-зависимыми характеристиками связывания. Среди аминокислот гистидин, для которого величина рКа составляет примерно 6,0-6,5, может обладать различными состояниями протонной диссоциации при нейтральном и кислом рН. Следовательно остаток гистидина в С5 может вносить вклад в рН-зависимые взаимодействия между антителом к С5 и С5. Не вдаваясь в какую-либо конкретную теорию, можно предположить, что антитело к С5 может распознавать конформационную структуру вокруг остатка гистидина в С5, которая изменяется в зависимости от значения рН. Это предположение может согласоваться с описанными ниже экспериментальными данными, свидетельствующими о том, что: рН-зависимость антитела к С5 снижается (или практически утрачивается), когда остаток гистидина в С5 заменяют на другую аминокислоту (т.е. антитело к С5 с рН-зависимыми характеристиками связывания связывается с мутантом по гистидина С5 (His-мутантом С5) с аффинностью, сходной с аффинностью к С5 дикого типа, при нейтральном рН, в то время как то же самое антитело связывается с His-мутантом С5 с более высокой аффинностью, чем с С5 дикого типа, при кислом рН).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к С5, предлагаемое в настоящем изобретении, связывается с С5 из более чем одного вида. В других вариантах осуществления изобретения антитело к С5 связывается с С5 человека и животного кроме человека. В других вариантах осуществления изобретения антитело к С5 связывается с С5 человека и обезьян (например, обезьян циномогус (яванский макак-крабед), макак резус, мармозеток, шимпанзе или бабуинов).

Одним из объектов изобретения являются антитела к С5, которые ингибируют активацию С5. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложены антитела к С5, который предупреждает расщепление С5, приводящее к образованию С5а и С5b, предупреждая тем самым возникновение анафилактической активности, ассоциированной с С5а, а также предупреждают сборку мембраноатакующего комплекса С5b-9 (МАС), ассоциированного с С5b. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложены антитела к С5, которые блокируют превращение С5 в С5а и С5b С5-конвертазой. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложены антитела к С5, которые блокируют доступ С5-конвертазы к сайту расщепления на С5. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложены антитела к С5, которые блокируют гемолитическую активность, обусловленную активацией С5. В других вариантах осуществления изобретения антитела к С5, предлагаемые в настоящем изобретении, ингибируют активацию С5 классическим путем и/или альтернативным путем.

Одним из объектов изобретения являются антитела к С5, которые ингибируют активацию варианта С5. Под вариантом С5 понимается генетический вариант С5, который получен путем генетической вариации, такой как мутация, полиморфизм или аллельная вариация. Генетическая вариация может включать делецию, замену или инсерцию одного или нескольких нуклеотидов. Вариант С5 может содержать одну или несколько генетических вариаций в С5. В некоторых вариантах осуществления изобретения вариант С5 обладает биологической активностью, сходной с биологической активностью С5 дикого типа. Такой вариант С5 может содержать по меньшей мере одну вариацию, выбранную из группы, которая состоит из V145I, R449G, V802I, R885H, R928Q, D966Y, S1310N и E1437D. В контексте настоящего описания R885H, например, обозначает генетическую вариацию, в результате которой аргинин в положении 885 заменен на гистидин. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к С5, предлагаемое в настоящем изобретении, ингибирует активацию как С5 дикого типа, так и по меньшей мере одного варианта С5, выбранного из группы, которая состоит из V145I, R449G, V802I, R885H, R928Q, D966Y, S1310N и E1437D.

Одним из объектов изобретения является антитело к С5, которое содержит по меньшей мере один, два, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из (а) HVR-H1, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 45-54; (б) HVR-H2, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 55-64; (в) HVR-H3, который содержит одну из аминокислотных

ID NO: 95, 104, 125, 131. В другом варианте осуществления изобретения антитело содержит HVR-H3, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128, HVR-L3, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 95, 104, 125, 131, и HVR-H2, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 55, 64, 118-120, 127. В следующем варианте осуществления изобретения антитело содержит (а) HVR-H1, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 45, 54, 117, 126; (б) HVR-H2, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 55, 64, 118-120, 127; и (в) HVR-H3, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128.

Другим объектом изобретения является антитело, содержащее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (а) HVR-L1, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 75, 84, 122, 129; (б) HVR-L2, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 85, 94, 123-124, 130; и (в) HVR-L3, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 95, 104, 125, 131. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит (а) HVR-L1, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 75, 84, 122, 129; (б) HVR-L2, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 85, 94, 123-124, 130; и (в) HVR-L3, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 95, 104, 125, 131.

Другим объектом изобретения является антитело, предлагаемое в изобретении, которое содержит (а) VH-домен, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (I) HVR-H1, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 45, 54, 117, 126, (II) HVR-H2, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 55, 64, 118-120, 127, и (III) HVR-H3, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128; и (б) VL-домен, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (I) HVR-L1, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 75, 84, 122, 129, (II) HVR-L2, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 85, 94, 123-124, 130, и (в) HVR-L3, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 95, 104, 125, 131.

Другим объектом изобретения является антитело, содержащее (а) HVR-H1, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 45, 54, 117, 126; (б) HVR-H2, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 55, 64, 118-120, 127; (в) HVR-H3, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 65, 74, 121, 128; (г) HVR-L1, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 75, 84, 122, 129; (д) HVR-L2, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 85, 94, 123-124, 130; и (е) HVR-L3, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 95, 104, 125, 131.

В некоторых вариантах осуществления изобретения одна или несколько аминокислот антитела к C5, как указано выше, заменены в следующих положениях в HVR: (а) в HVR-H1 (SEQ ID NO: 45) в положениях 5 и 6; (б) в HVR-H2 (SEQ ID NO: 55) в положениях 1, 3, 9, 11, 13 и 15; (в) в HVR-H3 (SEQ ID NO: 65) в положениях 2, 5, 6, 12 и 13; (г) в HVR-L1 (SEQ ID NO: 75) в положениях 1, 5, 7 и 9; (д) в HVR-L2 (SEQ ID NO: 85) в положениях 4, 5 и 6; и (е) в HVR-L3 (SEQ ID NO: 95) в положениях 2, 4 и 12.

В некоторых вариантах осуществления изобретения замены представляют собой консервативные замены, как указано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения можно осуществлять одну или несколько из указанных ниже замен в любой комбинации: (а) в HVR-H1 (SEQ ID NO: 45) M5V или C6A; (б) в HVR-H2 (SEQ ID NO: 55) C1A или G, Y3F, T9D или E, Y11K или Q, S13D или E, или A15V; (в) в HVR-H3 (SEQ ID NO: 65) G2A, V5Q или D, T6Y, Y12H или L13Y; (г) в HVR-L1 (SEQ ID NO: 75) Q1R, N5Q или G, G7S, D9K или S; (д) в HVR-L2 (SEQ ID NO: 85) K4T или E, L5T или A6H, A6E или A6Q; (е) в HVR-L3 (SEQ ID NO: 95) C2S, C2N или C2T, F4K; или A12T, или A12H.

Все возможные комбинации указанных выше замен входят в консенсусные последовательности SEQ ID NO: 126, 127, 128, 129, 130 и 131 для HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 соответственно.

В любом из указанных выше вариантов осуществления изобретения антитело к C5 является гуманизированным. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к C5 содержит HVR, представленные в любом из указанных выше вариантов осуществления изобретения, и содержит также акцепторный человеческий каркасный участок, например, каркасный участок человеческого иммуноглобулина или человеческого консенсусный каркасный участок. В другом варианте осуществления изобретения антитело к C5 содержит HVR, представленные в любом из указанных выше вариантов осуществления изобретения, и содержит также VH или VL, содержащие последовательность FR, где последовательности FR представляют собой следующие последовательности. В случае варибельного домена тяжелой цепи FR1 содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 132-134, FR2 содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 135-136, FR3 содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 137-139, FR4 содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 140-141. В случае варибельного домена легкой цепи FR1 содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 142-143, FR2 содержит одну из аминокислотных по-

следовательностей SEQ ID NO: 144-145, FR3 содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 146-147, FR4 содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 148.

В другом объекте изобретения антитело к C5 содержит последовательность варибельного домена тяжелой цепи (VH), которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-10. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность VH, идентичная по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%, содержит замены (например, консервативные замены), инсерции или делеции относительно референс-последовательности, но антитело к C5, содержащее указанную последовательность, сохраняет способность связываться с C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения в целом от 1 до 10 аминокислот заменено, встроено и/или удалено путем делеции в одной из SEQ ID NO: 13, 16-30 и 32-34. В некоторых вариантах осуществления изобретения замены, инсерции или делеции затрагивают области вне HVR (т.е. FR). Необязательно антитело к C5 содержит последовательность VH, представленную в одной из SEQ ID NO: 1-10, включая посттрансляционные модификации указанной последовательности. В конкретном варианте осуществления изобретения VH содержит один, два или три HVR, выбранных из: (а) HVR-H1, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 45-54, (б) HVR-H2, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 55-64, и (в) HVR-H3, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 65-74.

В другом объекте изобретения антитело к C5 содержит последовательность VL, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 11-20. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность VL, идентичная по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%, содержит замены (например, консервативные замены), инсерции или делеции относительно референс-последовательности, но антитело к C5, содержащее указанную последовательность, сохраняет способность связываться с C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения в целом от 1 до 10 аминокислот заменено, встроено и/или удалено путем делеции в одной из SEQ ID NO: 11-20. В некоторых вариантах осуществления изобретения замены, инсерции или делеции затрагивают области вне HVR (т.е. FR). Необязательно антитело к C5 содержит последовательность VL, представленную в одной из SEQ ID NO: 15, 31, 35-38 и 96-99, включая пост-трансляционные модификации указанной последовательности. В конкретном варианте осуществления изобретения VL содержит один, два или три HVR, выбранных из: (а) HVR-L1, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 75-84; ((б) HVR-L2, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 85-94; и (в) HVR-L3, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 95-104.

Другим объектом изобретения является антитело к C5, где антитело содержит VH, представленную в одном из указанных выше вариантов осуществления изобретения, и VL, представленную в одном из указанных выше вариантов осуществления изобретения. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит последовательности VH и VL, представленные в одной из SEQ ID NO: 1-10 и одной из SEQ ID NO: 11-20 соответственно, включая посттрансляционные модификации указанных последовательностей.

В другом объекте изобретения антитело к C5 содержит последовательность варибельного домена тяжелой цепи (VH), которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична одной из аминокислотных последовательностей: 10, 106-110. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность VH, идентичная по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%, содержит замены (например, консервативные замены), инсерции или делеции относительно референс-последовательности, но антитело к C5, содержащее указанную последовательность, сохраняет способность связываться с C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения в целом от 1 до 10 аминокислот заменено, встроено и/или удалено путем делеции в одной из SEQ ID NO: 10, 106-110. В некоторых вариантах осуществления изобретения замены, инсерции или делеции затрагивают области вне HVR (т.е. FR). Необязательно антитело к C5 содержит последовательность VH, представленную в одной из SEQ ID NO: 10, 106-110, включая посттрансляционные модификации указанной последовательности. В конкретном варианте осуществления изобретения VH содержит один, два или три HVR, выбранных из: (а) HVR-H1, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 45, 54, 117, 126, (б) HVR-H2, который содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 55, 64, 118-120, 127, и (в) HVR-H3, который содержит одну из аминокислотных последовательностей: 65, 74, 121, 128.

В другом объекте изобретения антитело к C5 содержит последовательность VH, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична одной из аминокислотных последовательностей: SEQ ID NO: 10, 106-110. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность VH, идентичная по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%, содержит замены (например, консервативные замены), инсерции или делеции относительно референс-последовательности, но антитело к C5, содержащее указанную последовательность, сохраняет способность связываться с C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения в целом от 1 до 10 аминокислот заменено, встроено и/или удалено путем делеции в одной из SEQ ID NO: 10, 106-110. В некоторых вариантах осуществления

ния изобретения предложено антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело, указанное в табл. 2. Как продемонстрировано в представленных ниже примерах осуществления изобретения, все антитела к C5, указанные в табл. 2, сгруппированы в одну "корзину" для указанного эпитопа C5 и обладают рН-зависимыми характеристиками связывания.

Дополнительным объектом изобретения является антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело, представленное в настоящем описании. Другим объектом изобретения является антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело, указанное в табл. 7. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложено антитело, которое связывается с эпитопом, присутствующим во фрагменте, который состоит из аминокислот 33-124 бета-цепи C5 (SEQ ID NO: 40). В некоторых вариантах осуществления изобретения предложено антитело, которое связывается с эпитопом в бета-цепи C5 (SEQ ID NO: 40), который содержит по меньшей мере один фрагмент, выбранный из группы, которая состоит из аминокислот 47-57, 70-76 и 107-110. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложено антитело, которое связывается с эпитопом во фрагменте бета-цепи C5 (SEQ ID NO: 40), который содержит по меньшей мере одну аминокислоту выбранную из группы, которая состоит из Thr47, Glu48, Ala49, Phe50, Asp51, Ala52, Thr53, Lys57, His70, Val71, His72, Ser74, Glu76, Val107, Ser108, Lys109 и His110. В другом варианте осуществления изобретения эпитоп для антитела к C5, предлагаемого в настоящем изобретении, представляет собой конформационный эпитоп.

В другом объекте изобретения антитело к C5, предлагаемое в одном из указанных выше вариантов осуществления изобретения, представляет собой моноклональное антитело, включая химерное, гуманизованное или человеческое антитело. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к C5 представляет собой фрагмент антитела, например, Fv, Fab, Fab', scFv, диабоды или F(ab')₂-фрагмент. В другом варианте осуществления изобретения антитело представляет собой полноразмерное антитело, например, интактное антитело IgG1- или IgG4-класса, или антитело другого класса или изотипа, указанное в настоящем описании.

Согласно другому объекту изобретения антитело к C5 по одному из указанных выше вариантов осуществления изобретения, может обладать любыми из описанных ниже в разделах 1-7 характеристик индивидуально или в комбинации.

1. Аффинность антител.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, имеет величину константы диссоциации (Kd), составляющую 1 мкМ или менее, 100 нМ или менее, 10 нМ или менее, 1 нМ или менее, 0,1 нМ или менее, 0,01 нМ или менее, или 0,001 нМ или менее (например 10^{-8} М или менее, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М).

В одном из вариантов осуществления величину Kd измеряют с помощью анализа связывания несущего радиоактивную метку антигена (РИА). В одном из вариантов осуществления изобретения РИА осуществляют с использованием Fab-версии представляющего интерес антитела и его антигена. Например, измеряют в растворе аффинность связывания Fab с антигеном путем уравновешивания Fab минимальной концентрацией ¹²⁵I-меченного антигена в присутствии полученных титрованием разведенный немеченного антигена, осуществляя затем "захват" связанного антигена на сенсibilизированном антителом к Fab планшете (см., например, Chen и др., J. Mol Biol 293, 1999, сс. 865-881). Для обеспечения условий, необходимых для проведения анализа, многолуночные планшеты MICROTITER® (фирма Thermo Scientific) сенсibilизируют в течение ночи "захватывающим" антителом к Fab (фирма Cappel Labs) в концентрации 5 мкг/мл в 50мМ карбонате натрия (рН 9,6) и затем блокируют с помощью 2% (мас./об) бычьего сывороточного альбумина в ЗФР в течение 2-5 ч при комнатной температуре (примерно 23°C). В неадсорбирующем планшете (фирма Nunc, № 269620) смешивают взятый в концентрации 100 или 26пМ меченный с помощью ¹²⁵I антиген с серийными разведениями представляющего интерес Fab (например, пригодного для оценки антитела к VEGF, Fab-12, см. Presta и др., Cancer Res. 57, 1997, сс. 4593-4599). Затем представляющий интерес Fab инкубируют в течение ночи; однако инкубацию можно осуществлять в течение более продолжительного периода времени (например, в течение 65 ч) для того, чтобы гарантировать достижение равновесия. После этого смеси переносят в подготовленный для "захвата" планшет и инкубируют при комнатной температуре (например, в течение 1 ч). Затем раствор удаляют и планшет промывают восемь раз 0,1% полисорбатом 20 (TWEEN-20®) в ЗФР. После просушки планшетов в них добавляют по 150 мкл/лунку сцинтилляционной жидкости ((MICROSCINT-20™; фирма Packard) и осуществляют считывание планшетов с помощью гамма-счетчика TOPCOUNT™ (фирма Packard) в течение 10 мин. Для осуществления анализа связывания в условиях конкуренции выбирают концентрации каждого Fab, обеспечивающие уровень связывания, составляющий менее или равный 20% от максимального.

В другом варианте осуществления изобретения Kd измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса с помощью устройства BIACORE®. Например, анализ осуществляют с помощью устройства BIACORE®-2000 или BIACORE®-3000 (фирма GE Healthcare Inc., Пискаатавей, шт. Нью-Джерси) при 25°C с использованием антигена, иммобилизованного на CM5-чипах с уровнем иммобилизации, соответствующим ~10 единицам ответа (RU). В одном из вариантов осуществления изобретения биосенсорные чипы из карбоксиметилированного декстрана (CM5, фирма GE Healthcare Inc.) активируют с помощью

гидрохлорида N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимид (NHS) согласно инструкциям поставщика. Антиген разводят 10мМ ацетатом натрия, pH 4,8 до концентрации 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) перед инъекцией со скоростью потока 5 мкл/мин для достижения уровня иммобилизации, соответствующего примерно 10 единицам ответа (RU) сшитого белка. После инъекции антигена инъецируют 1М этаноламин для блокады непрореагировавших групп. Для кинетических измерений инъецируют двукратные серийные разведения Fab (от 0,78 до 500 нМ) в ЗФР, дополненном 0,05% полисорбата 20 (TWEEN-20™) в качестве сурфактанта (ЗФРТ), при 25°C со скоростью потока примерно 25 мкл/мин. Скорость реакции ассоциации (k_{on}) и реакции диссоциации (k_{off}) рассчитывают с использованием простой модели связывания Ленгмюра 1:1 (программное обеспечение Evaluation версия 3.2, BIACORE®) путем одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Константу равновесия реакции диссоциации (Kd) рассчитывают как соотношение k_{off}/k_{on} (см., например, Chen и др., *J Mol Biol* 293, 1999, сс. 865-881). Если скорость реакции ассоциации превышает $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ при оценке с помощью описанного выше метода поверхностного плазмонного резонанса, то скорость реакции ассоциации можно определять с помощью метода гашения флуоресценции, который позволяет измерять повышение или снижение интенсивности излучения флуоресценции (длина волны возбуждения 295 нм; длина волны испускания 340 нм, полоса пропускания 16 нм) при 25°C применяемого в концентрации 20 нМ антитела к антигену (Fab-формат) в ЗФР, pH 7,2, в присутствии возрастающих концентраций антигена, осуществляя измерения с помощью спектрометра, такого как спектрофотометр, снабженный блоком для остановки потока (фирма Aviv Instruments), или спектрофотометр SLM-AMINCO™ серии 8000 (фирма ThermoSpectronic), при перемешивании содержимого кюветы.

2. Фрагменты антител.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, представляет собой фрагмент антитела. Фрагменты антител включают (но, не ограничиваясь только ими) такие фрагменты как Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv и scFv и другие описанные ниже фрагменты. Обзор некоторых фрагментов антител см., у Hudson и др., *Nat. Med.* 9, 2003, сс. 129-134. Обзор scFv-фрагментов см., например, у Plueckthun в: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, под ред. Rosenberg и Мооге, изд-во Springer, New York, т. 113, 1994, сс. 269-315; см. также WO 93/16185; и US №№ 5571894 и 5587458. Обсуждение, касающееся Fab- и F(ab')₂-фрагментов, которые содержат остатки эпитопа, связывающегося с рецептором спасения, и обладают удлиненным временем полужизни *in vivo*, см. в US № 5869046.

Димерные антитела представляют собой фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими центрами, которые могут быть двухвалентными или биспецифическими (см., например, EP 0404097; WO 1993/01161; Hudson и др., *Nat. Med.* 9, 2003, сс. 129-134; и Holliger и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1993, сс. 6444-6448). Тримерные и тетрамерные антитела описаны также у Hudson и др., *Nat. Med.* 9, 2003, сс. 129-134).

Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие весь переменный домен тяжелой цепи или его часть, или весь переменный домен легкой цепи антитела или его часть. В некоторых вариантах осуществления изобретения однодоменное антитело представляет собой человеческое однодоменное антитело (фирма Domantis, Inc., Уолтхэм, шт. Массачусетс; см., например, US № 6248516).

Фрагменты антител можно создавать различными методиками, включая (но не ограничиваясь только ими) протеолитическое расщепление интактного антитела, а также получать с помощью рекомбинантных клеток-хозяев (например, *E. coli* или фаг), указанных в настоящем описании.

3. Химерные и гуманизированные антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, указанное в настоящем описании, представляет собой химерное антитело. Некоторые химерные антитела описаны, например, в US № 4816567; и у Morrison и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1984, сс. 6851-6855. В одном из примеров химерное антитело содержит нечеловеческую переменную область (например, переменную область из антитела мышей, крыс, хомяков, кроликов или приматов кроме человека, таких как обезьяны) и человеческую константную область. В другом примере химерное антитело представляет собой антитело "переключенного класса", класс или подкласс которого был изменен относительно родительского антитела. Химерные антитела включают их антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления изобретения химерное антитело представляет собой гуманизированное антитело. Как правило, нечеловеческое антитело гуманизируют для снижения иммуногенности для людей, сохраняя при этом специфичность и аффинность родительского нечеловеческого антитела. Как правило, гуманизированное антитело содержит один или несколько переменных доменов, в которых HVR, например, CDR (или их участки), получают из нечеловеческого антитела, а FR (или их участки) получают из последовательностей человеческого антитела. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть человеческой константной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения некоторые остатки FR в гуманизированном антителе заменены на соответствующие остатки из нечеловеческого антитела (например, антитела, из которого происходят

остатки HVR), например, для сохранения или улучшения специфичности или аффинности антитела.

Сведения о гуманизированных антителах и методах их создания обобщены, например, у Almagro, *Front. Biosci.* 13, 2008, сс. 1619-1633, и описаны также у Riechmann и др., *Nature* 332, 1988, сс. 323-329; Queen и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1989, сс. 10029-10033; US №№ 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Kashmiri и др., *Methods* 36, 2005, сс. 25-34 (описание трансплантации SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28, 1991, сс. 489-498 (описание "нанесения нового покрытия"); Dall'Acqua и др., *Methods* 36, 2005, сс. 43-60 (описание "перестановки FR"); и Osbourn и др., *Methods* 36, 2005, сс. 61-68 и Klimka и др., *Br. J. Cancer* 83, 2000, сс. 252-260 (описание подхода "направленной селекции" для перестановки FR).

Человеческие каркасные участки, которые можно применять для гуманизации, включают (но, не ограничиваясь только ими): каркасные участки, выбранные с использованием методов "наилучшего подбора" (см., например, Sims и др., *J. Immunol.* 151, 1993, сс. 2296-2308; каркасные участки, происходящие из консенсусной последовательности конкретной подгруппы переменных областей легких и тяжелых цепей человеческого антител (см., например, Carter и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1992, сс. 4285-4289 и Presta и др., *J. Immunol.* 151, 1993, сс. 2623-2632); человеческие зрелые (с соматическими мутациями) каркасные области или каркасные области человеческой зародышевой линии (см., например, Almagro и Fransson, *Front. Biosci.* 13, 2008, сс. 1619-1633); и каркасные участки, полученные в результате скрининга FR-библиотек (см., например, Vasa и др., *J. Biol. Chem.* 272, 1997, сс. 10678-10684 и Rosok и др., *J. Biol. Chem.* 271, 1996, сс. 22611-22618).

4. Человеческие антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, представляет собой человеческое антитело. Человеческие антитела можно получать, используя различные методики, известные в данной области. Человеческие антитела описаны в целом у van Dijk и van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 2001, сс. 368-374 и Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20, 2008, сс. 450-459.

Человеческие антитела можно получать путем введения иммуногена трансгенному животному, модифицированному таким образом, чтобы оно продуцировало интактные человеческие антитела или интактные антитела с человеческими переменными областями в ответ на контрольное заражение антигеном. Указанные животные, как правило, содержат все или часть локусов человеческого иммуноглобулина вместо эндогенных иммуноглобулиновых локусов, которые либо присутствуют вне хромосом, либо интегрированы произвольно в хромосомы животного. У таких трансгенных мышей эндогенные иммуноглобулиновые локусы, как правило, инактивированы. Обзор методов получения человеческих антител в трансгенных животных см. у Lonberg, *Nat. Biotech.* 23, 2005, сс. 1117-1125 (см., например, также в US №6075181 и US №6150584 описание технологии XENOMOUSE™; в US № 5770429 описание технологии HUMAB®; в US №7041870 описание технологии K-M MOUSE® и в публикации заявки на патент США 2007/0061900 описание технологии VELOCIMOUSE®). Человеческие переменные области из интактных антител, полученных с помощью указанных животных, можно дополнительно модифицировать, например, путем объединения с другой человеческой константной областью.

Человеческие антитела можно создавать с помощью методов на основе гибридом. Описаны клеточные линии человеческой миеломы и мышинной-человеческой гетеромиеломы, предназначенные для получения человеческих моноклональных антител (см., например, Kozbor, *J. Immunol.* 133, 1984, сс. 3001-3005; Brodeur и др., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, изд-во Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, сс. 51-63 и Boerner и др., *J. Immunol.* 147, 1991, сс. 86-95). Человеческие антитела, созданные с использованием технологии на основе человеческих В-клеточных гибридом, описаны также у Li и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 2006, сс. 3557-3562. Дополнительные методы включают методы, описанные, например, в US №7189826 (описание получения моноклональных человеческих антител типа IgM из клеточных линий гибридом), и у Ni, *Xiandai Mianyixue* 26, 2006, сс. 265-268 (описание человеческих-человеческих гибридом). Технология человеческих гибридом (технология Trioma) описана также у Vollmers и Brandlein, *Histology and Histopathology* 20, 2005, сс. 927-937 и Vollmers и Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27, 2005, сс. 185-191.

Человеческие антитела можно создавать также путем выделения последовательностей переменных доменов Fv-клонов, выбранных из фаговых дисплейных библиотек, для создания которых использовали человеческие антитела. Указанные последовательности переменных доменов затем можно объединять с требуемым человеческим константным доменом. Методики отбора человеческих антител из библиотек антител описаны ниже.

5. Антитела, полученные из библиотек.

Антитела, предлагаемые в изобретении, можно выделять путем скрининга комбинаторных библиотек антител с требуемой активностью или видами активности. Например, в данной области известны разнообразные методы для создания фаговых дисплейных библиотек и скрининга указанных библиотек в отношении антител, обладающих требуемыми характеристиками связывания. Указанные методы обобщены, например, у Hoogenboom и др., *Methods in Molecular Biology* 178, 2001, сс. 1-37, и описаны также, например, у McCafferty и др., *Nature* 348, 1990, сс. 552-554; Clackson и др., *Nature* 352, 1991, сс. 624-628; Marks и др., *J. Mol. Biol.* 222, 1992, сс. 581-597; Marks и Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248, 2003,

сс. 161-175; Sidhu и др., *J. Mol. Biol.* 338, 2004, сс. 299-310; Lee и др., *J. Mol. Biol.* 340, 2004, сс. 1073-1093; Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2004, сс. 12467-12472 и Lee и др., *J. Immunol. Methods* 284, 2004, сс. 119-132.

При осуществлении некоторых методов фагового дисплея популяции VH- и VL-генов клонируют по отдельности с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и рекомбинируют произвольно в фаговых библиотеках, которые затем подвергают скринингу в отношении антигенсвязывающего фага согласно методу, описанному у Winter и др., *Ann. Rev. Immunol.* 12, 1994, сс. 433-455. Фаг, как правило, экспонирует фрагменты антител либо в виде одноцепочечных Fv-фрагментов (scFv), либо в виде Fab-фрагментов. Библиотеки, полученные из иммунизированных источников, включают антитела, обладающие высокой аффинностью к иммуногену, при этом отсутствует необходимость в создании гибридом. Альтернативно этому, можно клонировать необработанную ("наивную") популяцию (например, из организма человека), получая один источник антител к широкому спектру чужих, а также своих антигенов без какой-либо иммунизации, что описано у Griffiths и др., *EMBO J.* 12, 1993, сс. 725-734. И, наконец, "наивные" библиотеки можно получать также методами синтеза путем клонирования неперегруппированных сегментов V-гена из стволовых клеток и с помощью ПЦР-праймеров, содержащих случайную последовательность, для кодирования гипервариабельных CDR3-участков и для осуществления перегруппировки *in vitro* согласно методу, описанному у Hoogenboom и Winter, *J. Mol. Biol.* 227, 1992, сс. 381-388. Фаговые библиотеки человеческих антител описаны, например, в следующих патентных публикациях: US № 5750373 и публикациях заявок на патент США 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 и 2009/0002360.

Антитела или фрагменты антител, выделенные из библиотек человеческих антител, рассматриваются как человеческие антитела или фрагменты человеческих антител.

6. Мультиспецифические антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, указанное в настоящем описании, представляет собой мультиспецифическое антитело, например, биспецифическое антитело. Мультиспецифические антитела представляют собой моноклональные антитела, которые имеют специфичности, связывающиеся по меньшей мере с двумя различными сайтами. В некоторых вариантах осуществления изобретения одна из связывающих специфичностей обеспечивает связывание с C5, а другая с любым другим антигеном. В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифические антитела могут связываться с двумя различными эпитопами C5. Биспецифические антитела можно применять также для локализации цитотоксических агентов в клетках, которые экспрессируют C5. Биспецифические антитела можно получать в виде полноразмерных антител или фрагментов антител.

Методики создания мультиспецифических антител включают (но, не ограничиваясь только ими) рекомбинантную совместную экспрессию двух пар тяжелых цепей-легких цепей иммуноглобулинов, обладающих различными специфичностями (см. Milstein и Cuellar, *Nature* 305, 1983, сс. 537-540, WO 93/08829 и Traubner и др., *EMBO J.* 10, 1991, сс. 3655-3659), и технологию "knob-in-hole" (обеспечение взаимодействия по типу "выступ-во впадину", см., например, US № 5731168). Мультиспецифические антитела можно получать также путем создания регулируемых электростатических воздействий для получения молекул антитела с гетеродимерными Fc (WO 2009/089004); перекрестного связывания двух или большего количества антител или фрагментов (см., например, US № 4676980 и Brennan и др., *Science* 229, 1985, сс. 81-83); применения "лейциновых молний" для получения биспецифических антител (см., например, Kostelny и др., *J. Immunol.* 148, 1992, сс. 1547-1553); применения технологии "димерных антител (диабоди)" для создания фрагментов биспецифических антител (см., например, Holliger и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1993, сс. 6444-6448); и применения димеров одноцепочечных Fv (sFv) (см., например, Gruber и др., *J. Immunol.* 152, 1994, сс. 5368-5374); и получения триспецифических антител согласно методу, описанному, например, у Tutt и др., *J. Immunol.* 147, 1991, сс. 60-69).

Под объем настоящего изобретения подпадают также сконструированные антитела с тремя или большим количеством функциональных антигенсвязывающих сайтов, включая "антитела-осьминоги" (см., например, US 2006/0025576A1).

Антитело или его фрагмент может включать также "Fab двойного действия" или "DAF", содержащий антигенсвязывающий сайт, который связывается с C5, а также с другим, отличным от него антигеном (см., например, US 2008/0069820).

7. Варианты антител.

Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к вариантам аминокислотных последовательностей антител, представленных в настоящем описании. Например, может требоваться повышать аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела можно получать путем интродукции соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем синтеза пептидов. Указанные модификации включают, например, делеции и/или инсерции, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Для получения конечной конструкции можно использовать любую комбинацию делеций, инсерций и замен, при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками, например, способностью связываться с антигеном.

а) Варианты, полученные путем замены, инсерции и делеции.

Некоторыми вариантами осуществления изобретения являются варианты антител, которые имеют одну или несколько аминокислотных замен. Сайты, представляющие интерес для замещающего мутагенеза, включают HVR и FR. Консервативные замены представлены ниже в табл. 1 под заголовком "предпочтительные замены", и они описаны ниже со ссылкой на классы боковых цепей аминокислот. Более важные замены представлены ниже в табл. 1 под заголовком "приведенные в качестве примера замены", и они описаны ниже со ссылкой на классы боковых цепей аминокислот. Аминокислотные замены можно интродуцировать в представляющее интерес антитело и продукты подвергать скринингу в отношении требуемой активности, например, сохранения/повышения способности к связыванию антигена, пониженной иммуногенности или повышенной ADCC или CDC.

Таблица 1

Исходный остаток	Приведенные в качестве примера замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Аминокислоты можно группировать на основе общих свойств боковых цепей следующим образом: (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) кислотные: Asp, Glu; (4) основные: His, Lys, Arg; (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro; (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Под неконсервативными заменами подразумевают замену представителя одного из указанных классов на представителя из другого класса.

Один из типов полученного в результате замены варианта включает замену одного или нескольких остатков гипервариабельного участка родительского антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела). Как правило, полученный(ые) в результате вариант(ы), отобранный(ые) для дополнительного исследования, должен(ы) иметь модификации (например, улучшения) некоторых биологических свойств (например, повышенную аффинность, пониженную иммуногенность) относительно родительского антитела, и/или должен(ы) иметь практически сохраненные определенные биологические свойства родительского антитела. Примером полученного в результате замены варианта является антитело с созревшей аффинностью, которое можно создавать, например, с использованием технологий созревания аффинности на основе фагового дисплея, например, указанных в настоящем описании. В целом, метод состоит в следующем: один или несколько остатков HVR подвергают мутации и варианты антител экспонируют на фаге и подвергают скринингу в отношении конкретной биологической активности (например, аффинности связывания).

Изменения (например, замены) можно осуществлять в HVR, например, для повышения аффинности антитела. Указанные изменения можно делать в "горячих (активных) точках" в HVR, т.е. остатках, кодируемых кодонами, которые с высокой частотой подвергаются мутации в процессе соматического созревания (см., например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207, 2008, сс. 179-196), и/или в остатках, которые контактируют с антигеном, с последующим тестированием варианта VH или VL в отношении аффинности связывания. Созревание аффинности путем создания и повторной селекции из вторичных библиотек описано, например, у Hoogenboom и др., *Methods in Molecular Biology* 178, 2002, сс. 1-37. В некоторых вариантах осуществления процесса созревания аффинности интродуцируют разнообразие в гены вариабельной области, выбранные для созревания, с помощью любого из широкого разнообразия методов (например, ПЦР пониженной точности, перестановка цепи или сайтнаправленный мутагенез с использованием олигонуклеотидов). Затем создают вторичную библиотеку. Затем библиотеку подвергают скринингу для идентификации любых вариантов антител с требуемой аффинностью. Другой метод, применяе-

мый для интродукции разнообразия, включает подходы, мишенью которых является HVR, при которых рандомизируют несколько остатков HVR (например, одновременно 4-6 остатков). Остатки HVR, участвующие в связывании антигена, можно специфически идентифицировать, например, используя аланин-сканирующий мутагенез или моделирование. Часто мишенями являются, прежде всего, CDR-H3 и CDR-L3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения замены, инсерции или делеции могут затрагивать один или несколько HVR, если указанные изменения не снижают существенно способность антитела связываться с антигеном. Например, в HVR могут быть сделаны консервативные изменения (например, консервативные замены, указанные в настоящем описании), которые не снижают существенно аффинность связывания. Указанные изменения, например, могут находиться вне принимающих участие в контактировании с антигеном остатков HVR. В некоторых вариантах осуществления изобретения в последовательностях вариантов VH и VL, указанных выше, каждый HVR либо является неизменным, либо содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

Ценным методом идентификации остатков или областей антитела, которые можно подвергать мутагенезу, является так называемый "аланин-сканирующий мутагенез", описанный у Cunningham и Wells, Science 244, 1989, сс. 1081-1085. При осуществлении этого метода остаток или группу остатков-мишеней (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) идентифицируют и заменяют на нейтральную или отрицательно заряженную аминокислоту (например, аланин или полиаланин) для решения вопроса о том, будет ли это влиять на взаимодействие антитела с антигеном. Дополнительные замены можно интродуцировать в те положения аминокислот, для которых продемонстрирована функциональная чувствительность к начальным заменам. В альтернативном или дополнительном варианте изучают кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между антителом и антигеном. Указанные контактирующие остатки и соседние остатки можно рассматривать в качестве мишеней или исключать из рассмотрения в качестве кандидатов для замены. Варианты можно подвергать скринингу для решения вопроса о том, обладают ли они требуемыми свойствами.

Инсерции в аминокислотные последовательности включают амино- и/или карбоксиконцевые слияния, варьирующие по длине от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или большее количество остатков, а также инсерции одного или нескольких аминокислотных остатков внутрь последовательности. Примером результата осуществления концевых инсерций является антитело с N-концевым метионильным остатком. Другие инсерционные варианты молекул антител включают слияние N- или C-концов антитела с ферментом (например, для ADEPT (антитело-направляемый фермент пролекарственной терапии) или полипептидом, который удлиняет время полужизни антитела в сыворотке.

б) Варианты гликозилирования.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, изменяют с целью повышения или понижения степени гликозилирования антитела. Добавление или делецию сайтов гликозилирования в антителе можно легко осуществлять путем такого изменения аминокислотной последовательности, которое позволяет создавать или удалять один или несколько сайтов гликозилирования.

Если антитело содержит Fc-область, то можно изменять присоединенный к ней углевод. Нативные антитела, которые продуцируются клетками млекопитающих, как правило, содержат разветвленный биантенный олигосахарид, который, как правило, присоединен с помощью N-связи к Asn297 CH2-домена Fc-области (см., например, Wright и др., TIBTECH 15, 1997, сс. 26-32). Олигосахарид может включать различные углеводы, например, маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в "стебле" биантенной олигосахаридной структуры. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификации олигосахаридов в антителе, предлагаемом в изобретении, можно осуществлять для создания вариантов антитела с определенными улучшенными свойствами.

Одним из вариантов осуществления изобретения являются варианты антитела, имеющие углеводную структуру, в которой снижено содержание фукозы, присоединенной (прямо или косвенно) к Fc-области. Например, содержание фукозы в указанной Fc-области может составлять от 1 до 80%, от 1 до 65%, от 5 до 65% или от 20 до 40%. Содержание фукозы определяют путем расчета среднего содержания фукозы в сахарной цепи на Asn297 относительно суммы всех гликоструктур, присоединенных к Asn297 (например, комплексных, гибридных структур и структур с высоким содержанием маннозы), которое измеряют с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии согласно методу, описанному, например, в WO 2008/077546. Asn297 обозначает остаток аспарагина, присутствующий примерно в положении 297 в Fc-области (EU-нумерация остатков Fc-области); однако вследствие минорных вариаций последовательности антитела Asn297 может располагаться также в положении, находящемся на расстоянии примерно +3 аминокислоты в прямом или обратном направлении от положения 297, т.е. между положениями 294 и 300. Указанные фукозилированные варианты могут обладать улучшенной ADCC-функцией (см., например, US 2003/0157108 (Presta L.); US 2004/0093621 (фирма Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Примерами публикаций, касающихся "дефукозилированных" вариантов антител или вариантов антител "с дефицитом фукозы" являются: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865;

WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki и др., *J. Mol. Biol.* 336, 2004, сс. 1239-1249; Yamane-Ohnuki и др., *Biotech. Bioeng.* 87, 2004, сс. 614-622). Примерами клеточных линий, которые обладают способностью продуцировать дефукозилированные антитела, являются Lec13 CHO-клетки с дефицитом белкового фукозилирования (Ripka и др., *Arch. Biochem. Biophys.* 249, 1986, сс. 533-545; US 2003/0157108 (Presta L.) и WO 2004/056312 (Adams и др., см., прежде всего, пример 11), и клеточные линии с "выключенным" геном, например, CHO-клетки с "выключенным" геном альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8 (см., например, Yamane-Ohnuki и др., *Biotech. Bioeng.* 87, 2004, сс. 614-622); Kanda и др., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4), 2006, сс. 680-688; и WO 2003/085107).

Кроме того, описаны варианты антител с бисекционными олигосахаридами, например, в которых бисекционный олигосахарид, присоединенный к Fc-области антитела, бисекционируется с помощью GlcNAc. Указанные варианты антител могут отличаться пониженным фукозилированием и/или повышенной ADCC-функцией. Примеры указанных вариантов антител описаны, например, в WO 2003/011878 (Jean-Mairet и др.); US № 6602684 (Umana и др.) и US 2005/0123546 (Umana и др.). Предложены также варианты антител по меньшей мере с одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc-области. Указанные варианты антител могут обладать повышенной CDC-функцией. Указанные варианты антител описаны, например, в WO 1997/30087 (Patel и др.); WO 1998/58964 (Raju S.); и WO 1999/22764 (Raju S.).

в) Варианты Fc-области.

Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения можно интродуцировать в Fc-область антитела, представленного в настоящем описании, одну или несколько аминокислотных модификаций, создавая тем самым вариант Fc-области. Вариант Fc-области может содержать последовательность человеческой Fc-области (например, Fc-области человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), включающую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или нескольких аминокислотных положениях.

Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к варианту антитела, который обладает некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает его перспективным кандидатом для путей применения, для которых является важным время полужизни антитела *in vivo*, однако некоторые эффекторные функции (такие как CDC и ADCC) не являются необходимыми или являются вредными. Можно осуществлять анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo* для подтверждения снижения/истощения CDC- и/или ADCC-активности. Например, можно осуществлять анализы связывания Fc-рецептора (FcR) для гарантии того, что у антитела отсутствует способность к связыванию с Fc-гамма R (и поэтому, вероятно, отсутствует ADCC-активность), но сохраняется способность связываться с FcRn. Первичные клетки, опосредующие ADCC, т.е. NK-клетки, экспрессируют только Fc-гамма RIII, в то время как моноциты экспрессируют Fc-гамма RI, Fc-гамма RII и Fc-гамма RIII. Данные об экспрессии FcR на гематопозитивских клетках обобщены в табл. 3 на с. 464 у Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9, 1991, сс. 457-492. Примерами анализов *in vitro* ADCC-активности представляющей интерес молекулы являются (но, не ограничиваясь только ими) анализы, описанные в US №5500362 (см., например, Hellstrom и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1986, сс. 7059-7063 и Hellstrom и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1985, сс. 1499-1502); US №5821337 (см. Bruggemann и др., *J. Exp. Med.* 166, 1987, сс. 1351-1361). В альтернативном варианте можно применять нерадиоактивные методы анализа (см., например, нерадиоактивный анализ цитотоксичности АСТИTM на основе проточной цитометрии (фирма CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью, шт. Калифорния); и нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96® (фирма Promega, Мэдисон, шт. Висконсин). Пригодными для таких анализов эффекторными клетками являются мононуклеарные клетки периферической крови (ПБМК) и естественные клетки-киллеры (NK). В альтернативном или дополнительном варианте ADCC-активность представляющей интерес молекулы можно оценивать *in vivo*, например, на животной модели, например, как описано у Clynes и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1998, сс. 652-656. Можно осуществлять также анализы связывания C1q для подтверждения того, что антитело не может связывать C1q и поэтому у него отсутствует CDC-активность (см., например, описание ELISA для оценки связывания C1q и C3c в WO 2006/029879 и WO 2005/100402). Для оценки активации комплемента можно осуществлять анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro и др., *J. Immunol. Methods* 202, 1996, сс. 163-171; Cragg и др., *Blood* 101, 2003, сс. 1045-1052; и Cragg, *Blood* 103, 2004, сс. 2738-2743). Определение FcRn-связывания и клиренса/времени полужизни *in vivo* можно осуществлять также с использованием методов, известных в данной области (см., например, Petkova и др., *Int'l. Immunol.* 18(12), 2006, сс. 1759-1769).

Антитела с пониженной эффекторной функцией включают антитела с заменой одного или нескольких следующих остатков Fc-области, таких как 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (см., например, US № 6737056). К указанным мутантам Fc относятся мутанты Fc с заменами в двух или большем количестве из следующих аминокислотных положений: 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый мутант "DNA" Fc-области, несущий замену остатков 265 и 297 на аланин (US № 7332581).

Описаны некоторые варианты антител с повышенной или пониженной способностью связываться с FcR (см., например, US № 6737056; WO 2004/056312 и Shields и др., *J. Biol. Chem.* 276, 2001, сс. 6591-

6604).

Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения вариант антитела содержит Fc-область с одной или несколькими аминокислотными заменами, которые повышают ADCC, например, замены в положениях 298, 333, и/или 334 Fc-области (EU-нумерация остатков).

В некоторых вариантах осуществления изобретения в Fc-области осуществляют изменения, которые приводят к измененной (т.е. либо повышенной, либо пониженной) способности связывать C1q и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC), что описано, например, в US № 6194551, WO 1999/51642 и у Idusogie и др., J. Immunol. 164, 2000, сс. 4178-4184.

Антитела с удлинённым временем полужизни и повышенной способностью к связыванию с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), который ответствен за перенос материнских IgG эмбриону (Guyer и др., J. Immunol. 117, 1976, сс. 587-593 и Kim и др., J. Immunol. 24, 1994, сс. 2429-2434), описаны в US 2005/0014934A1 (Hinton и др.). Эти антитела содержат Fc-область с одной или несколькими заменами, которые повышают связывание Fc-области с FcRn. Указанные варианты Fc-области включают варианты с заменами одного или нескольких следующих остатков Fc-области: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например, замену остатка 434 в Fc-области (US № 7371826).

Дополнительные примеры, касающиеся других вариантов Fc-области, описаны также у Duncan, Nature 322, 1988, сс. 738-740; в US №№ 5648260 и 5624821 и в WO 1994/29351.

г) Варианты антител, сконструированные с помощью цистеина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения может оказаться желательным создавать антитела, сконструированные с помощью цистеина, например, "тиоМАт", в которых один или несколько остатков в антителе заменены на остатки цистеина. В конкретных вариантах осуществления изобретения замененные остатки находятся в доступных сайтах антитела. Путем замены этих остатков на цистеин реакционноспособные тиольные группы помещаются в доступные сайты антитела и могут использоваться для конъюгации антитела с другими фрагментами, такими как фрагменты, представляющие собой лекарственное средство, или фрагменты, представляющие собой линкер, связанный с лекарственным средством, с созданием иммуноконъюгата, указанного ниже в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения любой(ые) один или несколько следующих остатков может(гут) быть заменен(ы) на цистеин: V205 (нумерация по Кэботу) легкой цепи; A118 (EU-нумерация) тяжелой цепи и S400 (EU-нумерация) Fc-области тяжелой цепи. Антитела, сконструированные с помощью цистеина, можно создавать согласно методу, например, описанному в US № 7521541.

д) Производные антител.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, можно дополнительно модифицировать таким образом, чтобы оно содержало дополнительные небелковые фрагменты, известные в данной области и легко доступные. Фрагменты, пригодные для дериватизации антитела, включают (но, не ограничиваясь только ими) водорастворимые полимеры. Примерами водорастворимых полимеров являются (но, не ограничиваясь только ими) полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры) и декстран- или поли(н-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры пропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Полиэтиленгликольпропиональдегид может иметь преимущество при производстве благодаря его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, присоединенных к антителу, может варьироваться и, если присоединено более одного полимера, то они могут представлять собой одинаковые или различные молекулы. В целом, количество и/или тип полимеров, применяемых для дериватизации, можно определять с учетом таких особенностей (но, не ограничиваясь только ими), как конкретные свойства или функции антитела, подлежащие усовершенствованию, предполагается ли применение производного антитела в терапии в определенных условиях, и т.д.

Другим вариантом осуществления изобретения являются конъюгаты антитела и небелкового фрагмента, которые можно избирательно нагревать, воздействуя на него излучением. В одном из вариантов осуществления изобретения небелковый фрагмент представляет собой углеродную нанотрубку (Kam и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 2005, сс. 11600-11605). Излучение может иметь любую длину волны и включает (но, не ограничиваясь только ими) длины волн, которые не повреждают обычные клетки, но которые нагревают небелковый фрагмент до температуры, при которой уничтожаются клетки, ближайшие к конъюгату: антитело-небелковый фрагмент.

Б. Методы рекомбинации и композиции

Антитела можно получать, используя методы рекомбинации и композиции, например, описанные в US №4816567. Одним из вариантов осуществления изобретения является выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к C5, представленное в настоящем описании. Другим вариантом осуществления изобретения является выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует полипептид, содержа-

щий вариант Fc-области или родительскую Fc-область, указанную в настоящем описании. Указанная нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL, и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкие и/или тяжелые цепи антитела). Следующим вариантом осуществления изобретения является(ются) один или несколько векторов (например, экспрессионных векторов), который(е) содержит(ат) указанную нуклеиновую кислоту. Еще одним вариантом осуществления изобретения является клетка-хозяин, которая содержит указанную нуклеиновую кислоту. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин содержит (например, в результате трансформации указанными векторами): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, например, клетку яичника китайского хомячка (CHO) или лимфоидную клетку (например, Y0-, NS0-, Sp20-клетку). Одним из вариантов осуществления изобретения является способ получения антитела к C5, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело, описанное выше, в условиях, пригодных для экспрессии антитела, и необязательно выделение антитела из клетки-хозяина (или среды для культивирования клетки-хозяина). Другим вариантом осуществления изобретения является способ получения полипептида, который содержит вариант Fc-области или родительскую Fc-область, включающий культивирование клетки-хозяина, которая содержит нуклеиновую(е) кислоту(ы), кодирующую(е) полипептид, такой как антитело, Fc-область или вариант Fc-области, указанный выше, в условиях, пригодных для экспрессии полипептида, и необязательно выделение полипептида из клетки-хозяина (или среды для культивирования клетки-хозяина).

Для рекомбинантного получения антитела к C5 нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело, например, описанные выше, выделяют и встраивают в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Для рекомбинантного получения Fc-области нуклеиновую кислоту, кодирующую Fc-область, выделяют и встраивают в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине.

Указанную нуклеиновую кислоту легко можно выделять и секвенировать с использованием общепринятых процедур (например, путем использования олигонуклеотидных зондов, которые обладают способностью специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

Приемлемые клетки-хозяева для клонирования или экспрессии кодирующих антитело векторов включают прокариотические или эукариотические клетки, представленные в настоящем описании. Например, антитела можно получать в бактериях, в частности, когда не требуется гликозилирование и связанная с Fc эффекторная функция. Сведения об экспрессии фрагментов антитела и полипептидов в бактериях см. например, в US №№ 5648237, 5789199 и 5840523 (см. также у Charlton в: *Methods in Molecular Biology*, под ред. Lo B.K.C., изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 245-254 описание экспрессии фрагментов антител в *E. coli*.) После экспрессии антитело можно выделять из пасты бактериальных клеток в виде растворимой фракции и можно дополнительно очищать.

Помимо прокариотических организмов в качестве хозяев, пригодных для клонирования или экспрессии плазмид, которые кодируют антитела, можно использовать эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были "гуманизированы", что позволяет получать антитело с частично или полностью человеческой схемой гликозилирования (см. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22, 2004, сс. 1409-1414 и Li и др., *Nat. Biotech.* 24, 2006, сс. 210-215).

Клетки-хозяева, которые можно использовать для экспрессии гликозилированного антитела, получают также из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных животных). Примерами клеток беспозвоночных являются клетки насекомых, а также можно применять клетки растений. Были выявлены многочисленные штаммы бакуловирусов и соответствующие пригодные для них в качестве хозяев клетки насекомых, прежде всего для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

В качестве хозяев можно применять также культуры растительных клеток (см., например, US №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описание технологии PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях).

В качестве хозяев можно применять также клетки позвоночных. Например, можно использовать клеточные линии млекопитающих, которые адаптированы к росту в суспензии. Другими примерами приемлемых линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная с помощью OB40 (COS-7); линия клеток почки эмбриона человека (HEK293-клетки или клетки линии 293, описанные, например, у Graham и др., *J. Gen. Virol.*, 36, 1977, сс. 59-74); клетки почки детеныша хомяка (ВНК); клетки Сертоли мыши (ТМ4-клетки, описанные, например, у Mather, *Biol. Reprod.*, 23, 1980, сс. 243-251); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки

печени бычьей крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, описанные, например, у Mather и др., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383, 1982, сс. 44-68); клетки MRC 5 и клетки FS4. Другими ценными линиями клеток-хозяев млекопитающих являются клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая DHFR⁻CHO-клетки (Urlaub и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1980, сс. 4216-4220); и клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор конкретных линий клеток-хозяев млекопитающих, которые можно применять для производства антител, см., например, у Yazaki и Wu, в: *Methods in Molecular Biology* под ред. В.К.С. Lo, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 255-268.

Поликлональные антитела предпочтительно вырабатываются у животных после нескольких подкожных (sc) или внутрибрюшинных (ip) инъекций релевантного антитела и адьюванта. Можно конъюгировать релевантный антиген с белком, иммуногенным для подлежащего иммунизации вида, например, гемоцианином лимфы улитки, сывороточным альбумином, бычьим тироглобулином или соевым ингибитором трипсина, с использованием бифункционального или дериватирующего агента, например, сложного сульфосукцинимидного эфира малеимидобензоила (конъюгация через остаток цистеина), N-гидроксисукцинимид (конъюгация через остаток лизина), глутарового альдегида, янтарного ангидрида, SOCl₂ или R¹N=C=NR, где R и R¹ обозначают различные алкильные группы.

Животных (как правило, млекопитающих кроме человека) иммунизируют с использованием антигена, иммуногенных конъюгатов или производных путем объединения, например, 100 или 5 мкг белка или конъюгата (для кроликов и мышей соответственно) с 3 объемами полного адьюванта Фрейнда, и осуществляют введение раствора внутривожно в несколько мест. Через 1 месяц животных подвергают бустерной вакцинации (ревакцинации) с использованием от 1/5 до 1/10 исходного количества пептида или конъюгата в полном адьюванте Фрейнда путем подкожной инъекции в несколько мест. Через 7-14 дней получают образцы крови животных и оценивают в сыворотке титр антитела. Животных подвергают ревакцинации вплоть до выхода титра на плато. Предпочтительно животных ревакцинируют с использованием конъюгата, в который входит тот же антиген, но конъюгированный с другим белком и/или через другой перекрестносшивающий реагент. Конъюгаты можно получать также в рекомбинантной клеточной культуре в виде белковых слияний. Кроме того, агрегирующие агенты, такие как квасцы, можно применять для усиления иммунного ответа.

Моноклональные антитела получают из популяции практически гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, входящие в популяцию, идентичны за исключением возможных встречающихся в естественных условиях мутаций и/или пост-трансляционных модификаций (например, изомеризации, амидирования), которые могут присутствовать в минорных количествах. Прилагательное "моноклональный" свидетельствует о том, что антитело не присутствует в смеси различных антител.

Например, моноклональные антитела можно получать, используя метод гибридом, впервые описанный Kohler и др., *Nature* 256(5517), 1975, сс. 495-497. При осуществлении метода гибрид мышь или другое пригодное в качестве хозяина животное, такое как хомяк, иммунизируют согласно описанному выше методу для выработки лимфоцитов, которые продуцируют или обладают способностью продуцировать антитела, специфически связывающиеся с белком, применяемым для иммунизации. Альтернативно этому, лимфоциты можно иммунизировать *in vitro*.

Иммунизирующий агент должен, как правило, включать антигенный белок или его слитый вариант. Как правило, применяют либо лимфоциты периферической крови (PBL), если требуются клетки человеческого происхождения, либо применяют селезеночные клетки или клетки лимфатических узлов, если источниками являются млекопитающие кроме человека. Затем лимфоциты сливают с иммортализованной клеточной линией с помощью приемлемого агента для слияния, такого как полиэтиленгликоль, с получением клетки гибридомы (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, изд-во Academic Press, 1986, сс. 59-103).

Иммортализованные клеточные линии, как правило, представляют собой трансформированные клетки млекопитающих, прежде всего клетки миеломы грызунов, быков и человека. Как правило, применяют крысиные или мышинные клеточные линии миеломы. Полученные таким образом клетки гибридомы высевают и выращивают в приемлемой культуральной среде, которая предпочтительно содержит одну или несколько субстанций, которые ингибируют рост или выживание неслитых родительских клеток миеломы. Например, если в родительских клетках миеломы отсутствует фермент гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), то культуральная среда для гибридом, как правило, включает гипоксантин, аминоптерин и тимидин (HAT-среда), т.е. субстанции, которые препятствуют росту клеток с дефицитом HGPRT.

Предпочтительными иммортализованными клетками миеломы являются клетки, которые можно эффективно сливать, которые поддерживают стабильный высокий уровень производства антитела отобранными антителопродуцирующими клетками и обладают чувствительностью к среде, такой как HAT-среда. Среди них предпочтительными являются мышинные линии миеломы, например, полученные из мышинных опухолей MOPC-21 и MPC-11, которые можно получать от фирмы Salk Institute Cell Distribution Center, Сан-Диего, шт. Калифорния, США, и SP-2-клетки (и их производные, например, X63-Ag8-653), которые можно получать из Американской коллекции типовых культур, Манассас, шт. Вирджиния,

США. Также описаны клеточные линии человеческой миеломы и мышино-человеческой гетеромиеломы, которые можно применять для производства человеческих моноклональных антител (Kozboj и др., *J. Immunol.* 133(6), 1984, сс. 3001-3005; Brodeur и др., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, изд-во Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, сс. 51-63).

Культуральную среду, в которой выращивают клетки гибридомы, оценивают в отношении производства моноклональных антител против антигена. Предпочтительно специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридомы, определяют с помощью иммунопреципитации или анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммуноанализ (РИА) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Указанные методики и анализы известны в данной области. Например, аффинность связывания можно определять с помощью анализа Скэтчарда, описанного у Munson, *Anal. Biochem.* 107(1), 1980, сс. 220-239.

После того, как установлено, что клетки гибридомы продуцируют антитела требуемой специфичности, аффинности и/или активности, клоны можно субклонировать, используя процедуры серийного разведения, и выращивать с помощью стандартных методов (Goding, выше). Приемлемые для этой цели культуральные среды включают, например, среду D-MEM или RPMI-1640. Кроме того, клетки гибридомы можно выращивать *in vivo* в виде опухолей в млекопитающих.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, можно отделять от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки с помощью общепринятых процедур очистки иммуноглобулинов, таких, например, как хроматография на белок А-сефарозе, гидроксипатите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

Антитела можно получать путем иммунизации приемлемого животного-хозяина антигеном. В одном из вариантов осуществления изобретения антиген представляет собой полипептид, содержащий полноразмерный C5. В одном из вариантов осуществления изобретения антиген представляет собой полипептид, содержащий бета-цепь (SEQ ID NO: 40) C5. В одном из вариантов осуществления изобретения антиген представляет собой полипептид, содержащий MG1-MG2-домен (SEQ ID NO: 43) бета-цепи C5. В одном из вариантов осуществления изобретения антиген представляет собой полипептид, содержащий MG1-домен (SEQ ID NO: 41) бета-цепи C5. В одном из вариантов осуществления изобретения антиген представляет собой полипептид, содержащий область, соответствующую аминокислотам в положениях 19-180 бета-цепи C5. В одном из вариантов осуществления изобретения антиген представляет собой полипептид, содержащий область, соответствующую аминокислотам в положениях 33-124 бета-цепи C5. В одном из вариантов осуществления изобретения антиген представляет собой полипептид, содержащий по меньшей мере один фрагмент, выбранный из аминокислот 47-57, 70-76 и 107-110 бета-цепи (SEQ ID NO: 40) C5. В одном из вариантов осуществления изобретения антиген представляет собой полипептид, содержащий фрагмент бета-цепи C5, который содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, которая состоит из Thr47, Glu48, Ala49, Phe50, Asp51, Ala52, Thr53, Lys57, His70, Val71, His72, Ser74, Glu76, Val107, Ser108, Lys109 и His110. В одном из вариантов осуществления изобретения антиген представляет собой полипептид, содержащий фрагмент бета-цепи C5, который содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, которая состоит из Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109 и His110. Под объем изобретения попадают также антитела, полученные путем иммунизации животного антигеном. Антитела могут обладать индивидуально или в комбинации любой из особенностей, которые описаны выше в разделе "Примеры антител к C5".

В. Анализы

Представленные в настоящем описании антитела к C5 можно идентифицировать, осуществлять их скрининг или характеризовать их физические/химические свойства и/или виды биологической активности с помощью различных анализов, известных в данной области.

1. Анализы связывания и другие анализы.

Согласно одному из объектов изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, тестируют в отношении антигенсвязывающей активности с использованием известных методов, таких как ELISA, Вестерн-блоттинг, BIACORE® и т.д. В одном из объектов изобретения полипептид, содержащий вариант Fc-области, предлагаемый в изобретении, тестируют в отношении активности связывания с его Fc-рецептором с помощью известных методов, таких как BIACORE® и т.д.

Согласно другому объекту изобретения можно использовать анализы в условиях конкуренции для идентификации антитела, которое конкурирует за связывание с C5 с любым антителом к C5, представленным в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения, когда указанное конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно блокирует (например, снижает) связывание референс-антитела с C5 по меньшей мере на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75% или более. В некоторых случаях связывание ингибируется по меньшей мере на 80, 85, 90, 95% или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанное конкурирующее антитело связывается с таким же эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), с которым связывается антитело к C5, представленное в настоящем описании (например, антитело к C5, описанное в табл. 2). Подробное описание приведенных в качестве примера методов картирования эпитопа, с которым связывается антитело,

представлено у Morris, Epitope Mapping Protocols, в: Methods in Molecular Biology, т. 66, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, 1996.

В качестве примера анализа в условиях конкуренции иммобилизованный C5 инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, которое связывается с C5, и второе немеченое антитело, подлежащее тестированию с отношении способности конкурировать с первым антителом за связывание с C5. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный C5 инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не второе немеченое антитело. После инкубации в условиях, приемлемых для связывания первого антитела с C5, избыток несвязанного антитела удаляют и измеряют количество метки, ассоциированной с иммобилизованным C5. Если количество метки, ассоциированной с иммобилизованным C5, существенно снижается в тестируемом образце по сравнению с контрольным образцом, то это свидетельствует о том, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с C5 (см., например, Harlow и Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, глава 14, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988).

Другим примером анализа в условиях конкуренции является BIACORE®-анализ, позволяющий оценивать способность тестируемого антитела к C5 конкурировать за связывание с C5 со вторым (референс) антителом к C5. В следующем варианте осуществления изобретения, в котором применяют устройство BIACORE® (например, BIACORE®3000) согласно рекомендациям производителя, белок C5 "захватывают" на CM5-чипе BIACORE® с помощью стандартного метода, известного в данной области, для создания покрытой C5 поверхности. Как правило, количество иммобилизованного на чипе C5 должно соответствовать 200-800 резонансным единицам (количество, которое обеспечивает легко измеряемые уровни связывания, но которое может легко насыщаться тестируемым антителом в применяемых концентрациях). Два антитела (т.е. тестируемое и референс-антитело), для которых требуется оценивать способность конкурировать друг с другом, смешивают в молярном соотношении сайтов связывания 1:1 в пригодном буфере, получая смесь для тестирования. При расчете концентраций на основе сайтов связывания за молекулярную массу тестируемого или референс-антитела принимают полную массу соответствующего антитела, деленную на количество сайтов связывания C5 на антителе. Концентрация каждого антитела (т.е. тестируемого и референс-антитела) в смеси для тестирования должна быть достаточно высокой для того, чтобы легко насыщать сайты связывания для этого антитела на молекулах C5, "захваченных" на BIACORE®-чипе. Тестируемое антитело и референс-антитело в смеси присутствуют в одинаковой молярной концентрации (на основе сайтов связывания), как правило, составляющей от 1,00 до 1,5 мкМ (на основе сайтов связывания). Приготавливают также отдельные растворы, содержащие только тестируемое антитело и только референс-антитело. Тестируемое антитело и референс-антитело в этих растворах должны находиться в таком же буфере и в таких же концентрациях и условиях, что и в смеси для тестирования. Смесь для тестирования, содержащую тестируемое антитело и референс-антитело, пропускают по поверхности покрытого C5 BIACORE®-чипа и регистрируют общий уровень связывания. Затем чип обрабатывают таким образом, чтобы удалить связанное тестируемое или референс-антитело без повреждения связанного с чипом C5. Как правило, это осуществляют путем обработки чипа 30мМ HCl в течение 60 с. Затем пропускают раствор, содержащий только тестируемое антитело, по покрытой C5 поверхности и регистрируют уровень связывания. Чип снова обрабатывают для полного удаления связанного антитела, не повреждая связанный с чипом C5. Затем пропускают раствор, содержащий только референс-антитело, по покрытой C5 поверхности и регистрируют уровень связывания. После этого рассчитывают теоретически максимально возможный уровень связывания для смеси тестируемого антитела и референс-антитела, который представляет собой сумму уровней связывания для каждого антитела (т.е. тестируемого антитела и референс-антитела) при пропускании их по покрытой C5 поверхности индивидуально. Если фактически измеренный уровень связывания для смеси оказывается меньше, чем указанный теоретический максимум, то тестируемое антитело и референс-антитело конкурируют друг с другом за связывание с C5. Так, как правило, конкурирующее тестируемое антитело к C5 представляет собой антитело, которое должно связываться с C5 по данным описанного выше BIACORE®-анализа блокирования таким образом, что при проведении анализа и в присутствии референс-антитела к C5 измеренный уровень связывания составляет от 80 до 0,1% (например, от менее чем 80 до 4%) от теоретического максимального уровня связывания, конкретно, от 75 до 0,1 % (например, от 75 до 4%) от теоретического максимального уровня связывания, и более конкретно, от 70 до 0,1% (например, от 70 до 4%) от теоретического максимального уровня связывания (как оно определено выше) для комбинации тестируемого антитела и референс-антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, конкурирует за связывание с C5 с антителом, которое содержит пару VH и VL, выбранную из пар VH и VL антител CFA0341 и CFA0330. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к C5 конкурирует за связывание с C5 с антителом, выбранным из: CFA0538, CFA0501, CFA0599, CFA0307, CFA0366, CFA0675 и CFA0672. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к C5 конкурирует за связывание с C5 с антителом CFA0329. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к C5 конкурирует за связывание с C5 с антителом CFA0666.

ID NO: 9, и VL, имеющей SEQ ID NO: 19; (з) VH, имеющей SEQ ID NO: 7, и VL, имеющей SEQ ID NO: 17; (и) VH, имеющей SEQ ID NO: 8, и VL, имеющей SEQ ID NO: 18, и (к) VH, имеющей SEQ ID NO: 10, и VL, имеющей SEQ ID NO: 20. В других вариантах осуществления изобретения антитело к C5 связывается с C5 с более высокой аффинностью при pH 7,4, чем при pH 5,8.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к C5 связывается с C5 с более высокой аффинностью при нейтральном pH, чем при кислом pH, и конкурирует за связывание с C5 с антителом, которое содержит пару VH и VL, выбранную из: (а) VH, имеющей SEQ ID NO: 5, и VL, имеющей SEQ ID NO: 15; (б) VH, имеющей SEQ ID NO: 4, и VL, имеющей SEQ ID NO: 14; (в) VH, имеющей SEQ ID NO: 6, и VL, имеющей SEQ ID NO: 16; (г) VH, имеющей SEQ ID NO: 2, и VL, имеющей SEQ ID NO: 12; (д) VH, имеющей SEQ ID NO: 3, и VL, имеющей SEQ ID NO: 13; (е) VH, имеющей SEQ ID NO: 1, и VL, имеющей SEQ ID NO: 11; (ж) VH, имеющей SEQ ID NO: 9, и VL, имеющей SEQ ID NO: 19; (з) VH, имеющей SEQ ID NO: 7, и VL, имеющей SEQ ID NO: 17, и (и) VH, имеющей SEQ ID NO: 8, и VL, имеющей SEQ ID NO: 18. В других вариантах осуществления изобретения антитело к C5 связывается с C5 с более высокой аффинностью при pH 7,4, чем при pH 5,8.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к C5 связывается с C5 с более высокой аффинностью при нейтральном pH, чем при кислом pH, и конкурирует за связывание с C5 с антителом, которое содержит пару VH и VL, выбранную из VH, имеющей SEQ ID NO: 1, и VL, имеющей SEQ ID NO: 11, или VH, имеющей SEQ ID NO: 10, и VL, имеющей SEQ ID NO: 20. В других вариантах осуществления изобретения антитело к C5 связывается с C5 с более высокой аффинностью при pH 7,4, чем при pH 5,8.

В некоторых вариантах осуществления изобретения можно определять, связывается ли антитело к C5, предлагаемое в настоящем изобретении, с определенным эпитопом, следующим образом: осуществляют экспрессию имеющих точечную мутацию мутантов C5, в которых аминокислота (за исключением аланина) в C5 заменена на аланин, в клетках линии 293 и оценивают связывание антитела к C5 с мутантами C5 методом ELISA, вестерн-блоттинга или BIACORE®; при этом существенное снижение или устранение связывания антитела к C5 с мутантом C5 по сравнению со связыванием с C5 дикого типа свидетельствует о том, что антитело к C5 связывается с эпитопом, содержащим указанную аминокислоту в C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения аминокислоту в C5, подлежащую замене на аланин, выбирают из группы, состоящей из Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109 и His110 бета-цепи C5 (SEQ ID NO: 40). В других вариантах осуществления изобретения аминокислота в C5, подлежащая замене на аланин представляет собой Asp51 или Lys109 бета-цепи C5 (SEQ ID NO: 40).

В другом варианте осуществления изобретения можно определять, связывается ли характеризующееся pH-зависимым связыванием антитело к C5, с определенным эпитопом, следующим образом: осуществляют экспрессию имеющих точечную мутацию мутантов C5, в которых остаток гистидина в C5 заменен на другую аминокислоту (например, на тирозин), в клетках линии 293 и оценивают связывание антитела к C5 с мутантами C5 методом ELISA, вестерн-блоттинга или BIACORE®; при этом существенное снижение связывания антитела к C5 с C5 дикого типа при кислом pH по сравнению с его связыванием с мутантом C5 при кислом pH, свидетельствует о том, что антитело к C5 связывается с эпитопом, содержащим указанный остаток гистидина на C5. В других вариантах осуществления изобретения связывание антитела к C5 с C5 дикого типа при нейтральном pH не снижается существенно по сравнению с его связыванием с мутантом C5 при нейтральном pH. В некоторых вариантах осуществления изобретения остаток гистидина в C5, подлежащий замене на другую аминокислоту, выбирают из группы, которая состоит из His70, His72 и His110 бета-цепи C5 (SEQ ID NO: 40). В следующем варианте осуществления изобретения остаток гистидина His70 заменяют на тирозин.

2. Анализы активности.

Одним из объектов изобретения являются анализы, предназначенные для идентификации антител к C5, которые обладают биологической активностью. Биологическая активность может включать, например, ингибирование активации C5, предупреждение расщепления C5 с образованием C5a и C5b, блокирование доступа C5-конвертазы к сайту расщепления на C5, блокирование гемолитической активности, вызываемой активацией C5 и т.д. Предложены также антитела, обладающие указанной биологической активностью *in vivo* и/или *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, тестируют в отношении указанной биологической активности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения определение того, ингибирует ли тестируемое антитело расщепление C5 с образованием C5a и C5b, осуществляют с помощью методов, описанных, например, у Isenman и др., J Immunol. 124(1), 1980, сс. 326-331. В другом варианте осуществления изобретения, это определяют с помощью методов, позволяющих специфически обнаруживать отщепленные белки C5a и/или C5b, например, с помощью вариантов ELISA или вестерн-блоттинга. Если в присутствии тестируемого антитела (или после контакта с ним) обнаруживают пониженное количество продукта расщепления C5 (т.е. C5a и/или C5b), то тестируемое антитело идентифицируют как антитело, которое может ингибировать расщепление C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения концентра-

цию и/или физиологическую активность C5a можно измерять с помощью таких методов, как, например, хемотаксический анализ, РИА, или ELISA (см., например, у Ward и Zvaifler *J. Clin. Invest.* 50(3), 1971, сс. 606-616).

В некоторых вариантах осуществления изобретения определение того, блокирует ли тестируемое антитело доступ C5-конвертазы к C5, осуществляют с помощью методов, позволяющих обнаруживать белковые взаимодействия между C5-конвертазой и C5, например, ELISA или BIACORE®. Если в присутствии тестируемого антитела (или после контакта с ним) имеет место снижение взаимодействий, то тестируемое антитело идентифицируют как антитело, которое может блокировать доступ C5-конвертазы к C5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения активность C5 можно оценивать по его способности осуществлять лизис клеток в общей воде индивидуума. Способность C5 осуществлять лизис клеток или ее снижение можно оценивать с помощью методов, хорошо известных в данной области, например, с помощью стандартного гемолитического анализа, такого как гемолитический анализ, описанный в *Experimental Immunochimistry*, под ред. Kabat и Mayer, 2-е изд., 135-240, изд-во CC Thomas, Springfield, IL, 1961, сс. 135-139, или стандартного варианта этого анализа, такого как метод гемолиза куриных эритроцитов, описанный, например, у Hillmen и др., *N. Engl. J. Med.* 350(6), 2004, сс. 552-559. В некоторых вариантах осуществления изобретения активность C5 или ее ингибирование оценивают количественно с помощью CH50eq-анализа. CH50eq-анализ представляет собой метод измерения общей активности классического пути комплемента в сыворотке. Этот тест представляет собой анализ литической активности, в котором используют сенсibilизированные антителом эритроциты в качестве активатора классического пути комплемента и применяют различные разведения тестируемой сыворотки для определения количества, необходимого для обеспечения 50%-ного лизиса (CH50). Процент гемолиза можно определять, например, с использованием спектрофотометра. CH50eq-анализ представляет собой средство косвенного измерения образования комплекса терминальных компонентов комплемента (ТСС), поскольку сами ТСС непосредственно ответственны за измеряемый гемолиз. Ингибирование активации C5 можно обнаруживать и/или измерять с помощью методов, изложенных и проиллюстрированных в экспериментальных примерах. Применяя анализы указанных или других пригодных типов, можно осуществлять скрининг антител-кандидатов, обладающих способностью ингибировать активацию C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибирование активации C5 включает снижение активации C5 по данным анализа по меньшей мере на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40%, или более по сравнению с воздействием отрицательного контроля в сходных условиях. В некоторых вариантах осуществления изобретения оно относится к ингибированию активации C5 по меньшей мере на 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% или более.

Г. Иммуноконъюгаты

В изобретении предложены также иммуноконъюгаты, содержащие антитело C5, представленное в настоящем описании, конъюгированное с одним или несколькими цитотоксическими агентами, такими как химиотерапевтические агенты или лекарственные средства, ингибирующие рост агенты, токсины (например, белковые токсины, обладающие ферментативной активностью токсины бактериального, грибного, растительного или животного происхождения или их фрагменты) или радиоактивные изотопы.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), в котором антитело конъюгировано с одним или несколькими лекарственными средствами, включая (но, не ограничиваясь только ими) майтансиноид (см. US №№ 5208020, 5416064 и EP 0425235 B1); ауристин, например, фрагменты DE и DF монометилауристината (ММАЕ и ММАF) (см. US №№ 5635483, 5780588 и 7498298); доластин; калихеамицин или его производные (см. US №№ 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001 и 5877296; Hinman и др., *Cancer Res.* 53, 1993, сс. 3336-3342; и Lode и др., *Cancer Res.* 58, 1998, сс. 2925-2928); антрациклин, такой как дауномицин или доксорубин (см. Kratz и др., *Curr. Med. Chem.* 13, 2006, сс. 477-523; Jeffrey и др., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 2006, сс. 358-362; Torgov и др., *Bioconjug. Chem.* 16, 2005, сс. 717-721; Nagy и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2000, сс. 829-834; Dubowchik и др., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12, 2002, сс. 1529-1532; King и др., *J. Med. Chem.* 45, 2002, сс. 4336-4343; и US № 6630579); метотрексат; виндесин; таксан, такой как доцетаксел, паклитаксел, ларотаксел, тесетаксел и ортатаксел; трихотецен и CC1065.

В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит антитело, представленное в настоящем описании, конъюгированное с обладающим ферментативной активностью токсином или его фрагментом, включая (но, не ограничиваясь только ими) А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, диантиновые белки, белки *Phytolaca americana* (РАPI, РАPII и РАР -5), ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены.

В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит антитело, представленное в настоящем описании, конъюгированное с радиоактивным атомом с образованием радиоактивного конъюгата. Широкое разнообразие радиоактивных изотопов можно применять для получения радиоактивных конъюгатов.

Примеры включают ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb и радиоактивные изотопы Lu. Когда радиоко́нъюгат применяют для детекции, то он может содержать радиоактивный атом для сцинтиграфических исследований, например, $\text{Tc}^{99\text{m}}$ или ^{123}I , или спиновую метку для визуализации методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (известный также как магнитно-резонансная визуализация, МРВ), такую как йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо. Конъюгаты антитела и цитотоксического агента можно получать с использованием широкого разнообразия бифункциональных связывающих белки агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), имиотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидозфиров (такие как диметилдипимидат×HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бисазидопроизводные (такие как бис(пара-азидобензоил)гександиамин), производные бисдиазония (такие как бис(пара-диазониумбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат), и обладающие двойной активностью фторсодержащие соединения (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин ризин можно получать согласно методу, описанному у Vitetta и др., Science 238, 1987, сс. 1098-1104. Меченная с помощью C^{14} 1-изотиоцианатбензил-3-метилдиэтилтриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является примером хелатирующего агента, применяемого для конъюгации радионуклеотида с антителом (см. WO 94/11026). Линкер может представлять собой "расщепляемый линкер", облегчающий высвобождение цитотоксического лекарственного средства. Например, можно использовать неустойчивый в кислой среде линкер, чувствительный к действию пептидаз линкер, фотолabile линкер, диметильный линкер или содержащий дисульфид линкер (Chari и др., Cancer Res. 52, 1992, сс. 127-131; US № 5208020).

В контексте настоящего описания под иммуноко́нъюгатами или ADC подразумеваются (но, не ограничиваясь только ими) указанные конъюгаты, полученные с использованием перекрестносшивающих реагентов, которые включают (но, не ограничиваясь только ими) BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB, а также SVSB (сукцинимидил(4-винилсульфон)бензоат), которые поступают в продажу (например, от фирмы Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, шт. Иллинойс, США).

Д. Способы и композиции для диагностирования и обнаружения

В некоторых вариантах осуществления изобретения любое из антител к C5, представленных в настоящем описании, можно применять для обнаружения присутствия C5 в биологическом образце. Понятие "обнаружение (детекция)" в контексте настоящего описания предусматривает количественное или качественное обнаружение. В одном из вариантов осуществления изобретения биологический образец содержит клетку или ткань, например, сыворотку, цельную кровь, плазму, полученный с помощью биопсии образец, образец ткани, клеточную суспензию, слюну, мокроту, оральную жидкость, спинномозговую жидкость, амниотическую жидкость, асцитную жидкость, молоко, молозиво, секрет молочных желез, лимфу, мочу, пот, слезную жидкость, желудочный сок, синовиальную жидкость, перитонеальную жидкость, жидкость хрусталика глаза или слезы.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антитело к C5, представленное в настоящем описании, для применения в способе диагностирования или обнаружения. Другой объект изобретения относится к способу обнаружения присутствия C5 в биологическом образце. В другом варианте осуществления изобретения способ включает приведение в контакт биологического образца с антителом к C5, представленным в настоящем описании, в условиях, обеспечивающих связывание антитела к C5 с C5, и выявление образования комплекса между антителом к C5 и C5. Указанный способ может представлять собой способ *in vitro* или *in vivo*. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к C5 применяют для отбора индивидуумов, которых можно лечить с помощью антитела к C5, например, когда C5 является биомаркером для отбора пациентов.

Некоторыми вариантами осуществления изобретения являются меченые антитела к C5. Метки включают (но, не ограничиваясь только ими) метки или фрагменты, которые можно обнаруживать непосредственно (такие как флуоресцентные, хромофорные, электронноплотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), а также фрагменты, такие как ферменты или лиганды, которые подлежат косвенному обнаружению, например, посредством ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия. Примеры меток включают (но, не ограничиваясь только ими) радиоизотопы ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H и ^{131}I , флуорофоры, такие как хелаты редкоземельных металлов или флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон, люциферазы, например, люцифераза светляка и бактериальная люцифераза (US №4737456), люциферин, 2,3-дигидрофалазиндионы, пероксидаза из хрена (HRP), щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, глюкоамилаза, лизоцим, оксидазы сахаридов, например, глюкозооксидаза, галактозооксидаза и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, гетероциклические оксидазы, такие как уриказа и ксантиноксидаза, сшитые с ферментом, который использует пероксид водорода для окисления предшественника красителя, такого как HRP, лактопероксидаза или микропероксидаза, биотин/авидин, спиновые метки, метки в виде бактериофагов, стабильные свободные радикалы и т.п.

Е. Фармацевтические композиции

Фармацевтические композиции антитела к С5, представленного в настоящем описании, получают путем смешения указанного антитела, имеющего необходимую степень чистоты, с одним или несколькими необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е изд. под ред. Osol A., 1980) в форме лиофилизированных композиций или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители, как правило, являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях, они включают (но, не ограничиваясь только ими): буферы, такие как фосфатный, цитратный буферы, а также буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензилламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол; бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и мета-крезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (содержащие менее приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поли(винилпирролидон); аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; содержащие металл комплексы (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). В контексте настоящего описания примеры фармацевтически приемлемых носителей включают также диспергирующие агенты интерстициальных лекарственных средств, такие как растворимые активные в нейтральной среде гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, человеческие растворимые гликопротеины гиалуронидазы PH-20, такие как gHuPH20 (HYLENEX®, фирма Baxter International, Inc.). Некоторые примеры sHASEGP и методы их применения, в том числе gHuPH20, описаны в публикациях патентов США №№ 2005/0260186 и 2006/0104968. Согласно одному из объектов изобретения sHASEGP объединяют с одним или несколькими дополнительными гликозаминогликанами, такими как хондроитиназы.

Примеры лиофилизированных композиций антител описаны в US № 6267958. Водные композиции антител включают композиции, описанные в US № 6171586 и WO 2006/044908, последние композиции включают гистидин-ацетатный буфер.

Композиция, предлагаемая в изобретении, может содержать также более одного действующего вещества, если это необходимо для конкретного подлежащего лечению показания, предпочтительно вещества с дополнительными видами активности, которые не оказывают отрицательного воздействия друг на друга. Такие действующие вещества должны присутствовать в комбинации в количествах, эффективных для достижения поставленной цели.

Действующие вещества можно включать также в микрокапсулы, например, полученные с помощью методов коацервации или межфазной полимеризации, например в гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы соответственно, в коллоидные системы введения лекарственного средства (например в липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е изд., под ред. Osol A., 1980.

Можно готовить препараты с замедленным высвобождением. Приемлемыми примерами препаратов с замедленным высвобождением являются полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, включающие антитело или конъюгат, такие матрицы представляют собой изделия определенной формы, например, пленки или микрокапсулы.

Композиции, предназначенные для применения *in vivo*, как правило, должны быть стерильными. Стерильность можно легко обеспечивать, например, путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

Ж. Терапевтические способы и композиции

Любое из антител к С5, представленных в настоящем описании, можно применять в терапевтических способах.

Одним из объектов изобретения является антитело к С5, предназначенное для применения в качестве лекарственного средства. Другие объекты изобретения относятся к антителу к С5, предназначенному для применения для лечения заболевания. Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к антителу к С5, предназначенному для применения в способе лечения. Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к антителу к С5, предназначенному для применения в способе лечения индивидуума, включающем введение индивидууму в эффективном количестве антитела С5. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения способ включает введение индивидууму в эффективном количестве по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства. "Индивидуум" в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения предпочтительно представляет собой человека.

Следующим объектом изобретения является применение антитела к С5 для приготовления или получения лекарственного средства. В одном из вариантов осуществления изобретения лекарственное

средство предназначено для лечения заболевания. В другом варианте осуществления изобретения лекарственное средство применяют в способе лечения заболевания, включающем введение индивидууму, имеющему заболевание, в эффективном количестве лекарственного средства. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения способ включает также введение индивидууму в эффективном количестве по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства. "Индивидуум" в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения предпочтительно представляет собой человека.

Другим объектом изобретения является способ лечения заболевания. В одном из вариантов осуществления изобретения способ включает введение индивидууму, имеющему указанное заболевание, в эффективном количестве антитела к C5, представленного в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления изобретения способ включает также введение индивидууму в эффективном количестве по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства. "Индивидуум" в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения может представлять собой человека.

Другим объектом изобретения являются фармацевтические композиции, содержащие любое из антител к C5, представленных в настоящем описании, которые предназначены, например, для применения в любом из указанных выше терапевтических способов. В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит любое из антител к C5, представленных в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит любое из антител к C5, представленных в настоящем описании, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство.

Следующим объектом изобретения является фармацевтическая композиция, предназначенная для лечения заболевания. В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическую композицию вводят индивидууму, который имеет заболевание. "Индивидуум" в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения предпочтительно представляет собой человека.

Следующим объектом изобретения являются способы приготовления лекарственного средства или фармацевтической композиции, включающие смешение любых антител к C5, представленных в настоящем описании, с фармацевтически приемлемым носителем, например, для применения в любом из указанных выше терапевтических способов. В одном из вариантов осуществления изобретения способы приготовления лекарственного средства или фармацевтической композиции дополнительно включают добавление по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства к лекарственному средству или фармацевтической композиции.

Антитела, предлагаемые в изобретении, для лечения можно применять либо индивидуально, либо в сочетании с другими агентами. Например, антитело, предлагаемое в изобретении, можно вводить совместно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством.

Такие комбинированные терапии, указанные выше, предусматривают совместное введение (когда два или большее количество терапевтических средств включены в одну и ту же или различные композиции) и раздельное введение, в каждом случае введение антитела или полипептида, содержащего вариант Fc-области, предлагаемый в изобретении, можно осуществлять до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического средства или средств. В одном из вариантов осуществления изобретения введение антитела к C5 и введение дополнительного терапевтического средства можно осуществлять в пределах примерно месяца или в пределах примерно 1, 2 или 3 недель, или в пределах примерно 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней друг относительно друга.

Антитело, предлагаемое в изобретении (и любое дополнительное терапевтическое средство), можно вводить любыми приемлемыми путями, включая парентеральный, внутривенный и интраназальный и при необходимости применять для местной обработки, введения в повреждение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Дозирование можно осуществлять любым приемлемым путем, например, путем инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, в зависимости, в том числе, от того, является ли лечение кратковременным или хроническим. Можно применять различные схемы дозирования, включая (но, не ограничиваясь только ими) однократное введение или несколько введений в различные моменты времени, болюсное введение и пульсирующую инфузию.

Антитела, предлагаемые в изобретении, можно включать в состав композиций, дозировать и вводить в соответствии с надлежащей клинической практикой. Рассматриваемые в этом контексте факторы включают конкретное нарушение, подлежащее лечению, конкретное млекопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние индивидуального пациента, причину нарушения, область введения агента, метод введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим медикам. Антитело можно, но это не является обязательным, включать в композицию в сочетании с одним или несколькими другими агентами, которые в настоящее время применяют для профилактики и лечения рассматриваемого нарушения. Эффективное количество указанных других агентов зависит от количества антитела, присутствующего в композиции, типа нарушения или лечения и других указанных выше факторов. Их, как правило, применяют в таких же дозах и с использованием таких же путей введения, которые указаны в настоящем описании, или в количестве, составляющем от 1 до 99% от дозы, указанной в настоящем описа-

нии, или в любой дозе и с помощью любого пути, которые по данным эмпирической/клинической оценки являются пригодными.

Для предупреждения или лечения заболевания приемлемая доза антитела, предлагаемого в изобретении (при его применении индивидуально или в сочетании с одним или несколькими другими дополнительными терапевтическими средствами), должна зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа антитела, типа полипептида, содержащего вариант Fc-области, серьезности и течения болезни, применяют ли антитело или полипептид, содержащий вариант Fc-области, для превентивных или терапевтических целей, предшествующей терапии, истории болезни пациента и ответа на антитело или полипептид, содержащий вариант Fc-области, а также предписания лечащего врача. Антитело или полипептид, содержащий вариант Fc-области, можно вводить пациенту однократно или в виде серий обработок. В зависимости от типа и серьезности заболевания примерно от 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,5-10 мг/кг) антитела может представлять собой начальную возможную дозу для введения пациенту, например, с помощью одной или нескольких отдельных обработок или с помощью непрерывной инфузии. Одним из примеров типичных суточных доз может являться доза, составляющая от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более в зависимости от указанных выше факторов. При использовании повторных введений в течение нескольких дней или более длительного периода времени, в зависимости от состояния, лечение, как правило, следует продолжать до достижения подавления симптомов заболевания. Одним из примеров доз антитела или полипептида, содержащего вариант Fc-области, является доза, составляющая от примерно 0,05 до примерно 10 мг/кг. Так, пациенту можно вводить одну или несколько следующих доз: примерно 0,5, 2,0, 4,0 или 10 мг/кг (или любую их комбинацию). Указанные дозы можно вводить дробно, например, каждую неделю или каждые три недели (например, так, чтобы пациент получал от примерно двух до примерно двадцати, например, примерно шесть доз антитела или полипептида, содержащего вариант Fc-области). Можно применять начальную повышенную ударную дозу с последующим введением одной или нескольких более низких доз. С помощью общепринятых методов и анализов можно легко осуществлять мониторинг действия указанной терапии.

Очевидно, что любые из вышеуказанных композиций или терапевтических способов можно применять с использованием иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, вместо или в дополнение к антителу к C5.

3. Изделия

Другим объектом изобретения является изделие, которое содержит продукты, применяемые для лечения, предупреждения и/или диагностирования указанных выше нарушений. Изделие представляет собой контейнер и этикетку или листовку-вкладыш в упаковку, которые размещены на контейнере или вложены в него. Приемлемыми контейнерами являются, например банки, пузырьки, шприцы, пакеты для внутривенного раствора и т.д. Контейнеры можно изготавливать из различных материалов, таких как стекло или пластмасса. Контейнер содержит композицию, которая сама или в сочетании с другой композицией является эффективной для лечения, предупреждения и/или диагностирования состояния, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или пузырек, снабженный пробкой, которую можно прокалывать с помощью иглы для подкожных инъекций). По меньшей мере одно действующее вещество в композиции представляет собой антитело, предлагаемое в изобретении. На этикетке или листовке-вкладыше в упаковку указано, что композицию применяют для лечения выбранного состояния. Кроме того, изделие может включать (а) первый контейнер с находящейся в нем композицией, где композиция содержит антитело, предлагаемое в настоящем изобретении; и (б) второй контейнер с находящейся в нем композицией, где композиция содержит дополнительное цитотоксическое или иное терапевтическое средство. Согласно этому варианту осуществления изобретения изделие может содержать листовку-вкладыш в упаковку, которая содержит информацию о том, что композиции можно использовать для лечения конкретного состояния. В альтернативном или дополнительном варианте изделие может дополнительно включать второй (или третий) контейнер с фармацевтически приемлемым буфером, таким как бактериостатическая вода для инъекций (БСВИ), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, оно может включать другие продукты, необходимые с коммерческой точки зрения и с точки зрения потребителя, в частности, другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Как должно быть очевидно, любое из указанных выше изделий может включать иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, вместо или в дополнение к антителу к C5.

Примеры

Ниже приведены примеры методов и композиций, предлагаемых в изобретении. Как должно быть очевидно, различные другие варианты осуществления изобретения можно применять на практике на основе общего описания изобретения, представленного выше.

Пример 1. Получение C5.

1.1. Экспрессия и очистка рекомбинантного C5 человека и обезьян циномоглус.

Рекомбинантный человеческий C5 (NCBI GenBank, код доступа: NP_001726.2, SEQ ID NO: 39) кратковременно экспрессировали, используя клеточную линию FreeStyle293-F (фирма Thermo Fisher, Карлсбад, шт. Калифорния, США). Кондиционированные среды, в которых происходила экспрессия че-

ловеческого C5, разводили равным объемом воды milliQ, затем вносили в анионообменную колонку с Q-сефарозой FF или Q-сефарозой HP (фирма GE healthcare, Уппсала, Швеция), после чего элюировали с использованием градиента NaCl. Объединяли фракции, содержащие человеческий C5, после чего концентрацию соли и значение pH доводили до 80мМ NaCl и pH 6,4 соответственно. Полученный образец вносили в катионообменную колонку с SP-сефарозой HP (фирма GE healthcare, Уппсала, Швеция) и элюировали с использованием градиента NaCl. Фракции, содержащие человеческий C5, объединяли и вносили в колонку с керамическим гидроксипатитом СНТ (фирма Bio-Rad Laboratories, Геркулес, шт. Калифорния, США). Затем содержащий человеческий C5 элюат вносили в колонку с супердекс 200 для гель-фильтрации (фирма GE healthcare, Уппсала, Швеция). Фракции, содержащие человеческий C5, объединяли и хранили при -150°C.

Экспрессию и очистку рекомбинантного C5 обезьян циномолгус (NCBI GenBank, код доступа: XP_005580972, SEQ ID NO: 44) осуществляли тем же методом, который применяли для человеческой копии.

1.2. Очистка C5 обезьян циномолгус (супоC5) из плазмы.

Образец плазмы обезьян циномолгус вносили на SSL7-агарозу (фирма Invivogen, Сан-Диего, шт. Калифорния, США), после чего элюировали с использованием 100мМ ацетата натрия, pH 3,5. Фракции, содержащий супоC5, немедленно нейтрализовали и вносили в колонку, содержащую белок А HP (фирма GE healthcare, Уппсала, Швеция), в тандеме с колонкой с пептид М-агарозой (фирма Invivogen, Сан-Диего, шт. Калифорния, США). Затем проточную фракцию вносили в колонку для гель-фильтрации с супердекс 200 (фирма GE healthcare, Уппсала, Швеция). Фракции, содержащие супоC5, объединяли и хранили при -80°C.

Пример 2.

Создание антител к C5.

2.1. Скрининг антител.

Антитела к C5 получали, отбирали и анализировали следующим образом.

Новозеландских белых кроликов (NZW) возрастом 12-16 недель иммунизировали внутривенно человеческим C5 и/или обезьяньим C5 (50-100 мкг/дозу/кролика). Обработку указанной дозой повторяли 3-5 раз в течение 2-месячного периода. Через 1 неделю после последней иммунизации собирали образцы селезенки и крови иммунизированного кролика. Антигенспецифические В-клетки окрашивали меченым антигеном, сортировали с использованием клеточного FCM-сортера (FACS aria III, фирма BD) и высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 1 клетка/луночку вместе с 25000 EL4-клеток/луночку (из Европейской коллекции клеточных культур) и кондиционированной средой для активированных кроличьих Т-клеток, разведенной в 20 раз, и культивировали в течение 7-12 дней. EL4-клетки предварительно обрабатывали митомицином С (фирма Sigma, каталожный номер M4287) в течение 2 ч и промывали 3 раза. Кондиционированную среду для активированных кроличьих Т-клеток получали путем культивирования кроличьих тимоцитов в среде RPMI-1640, содержащей фитогемагглютинин-М (фирма Roche, каталожный номер 1 1082132-001), форбол-12-миристан-13-ацетат (фирма Sigma, каталожный номер P1585) и 2% FBS. После культивирования супернатанты В-клеточных культур собирали для дополнительного анализа и дебрис криоконсервировали.

ELISA-анализ применяли для оценки специфичности антител в супернатанте В-клеточной культуры. 384-луночные планшеты MAXISorp (фирма Nunc, каталожный номер 164688) сенсibilizировали стрептавидином (фирма GeneScript, каталожный номер Z02043) в концентрации 50 нМ в 3ФР в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты блокировали с помощью реагента Blocking One (фирма Nalcalai Tesque, каталожный номер 03953-95), разведенного в 5 раз. Человеческий или обезьяньий C5 метили с помощью NHS-ПЭГ4-биотина (фирма PIERCE, каталожный номер 21329) и добавляли в заблокированные планшеты для ELISA, инкубировали в течение 1 ч и промывали. Супернатанты В-клеточных культур вносили в планшеты для ELISA, инкубировали в течение 1 ч и промывали. Связывание выявляли с помощью козьего антикроличьего IgG, конъюгированного с пероксидазой из хрена (фирма BETHYL, каталожный номер A120-111P), для чего добавляли ABTS (фирма KPL, каталожный номер 50-66-06).

ELISA-анализ применяли для оценки pH-зависимого связывания антител к C5. Козий антикроличий IgG-Fc (фирма BETHYL, каталожный номер A120-111A), разведенный до 1 мкг/мл с использованием 3ФР(-), добавляли в 384-луночный планшет MAXISorp (фирма Nunc, каталожный номер 164688), инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и блокировали с помощью реагента Blocking One (фирма Nalcalai Tesque, каталожный номер 03953-95), разведенного в 5 раз. После инкубации планшеты промывали и добавляли супернатанты В-клеточных культур. Планшеты инкубировали в течение 1 ч, промывали и добавляли 500пМ биотинилированный человеческий или обезьяньий C5, и инкубировали в течение 1 ч. После инкубации планшеты промывали и инкубировали либо с MES-буфером, pH 7,4 (20мМ MES, 150мМ NaCl и 1,2мМ CaCl₂), либо с MES-буфером, pH 5,8 (20мМ MES, 150мМ NaCl и 1мМ ЭДТА) в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубации выявляли связывание биотинилированного C5 с помощью конъюгата стрептавидин-пероксидазы из хрена (фирма Thermo Scientific, каталожный номер 21132), для чего добавляли ABTS (фирма KPL, каталожный номер 50-66-06).

Систему Octet RED384 (фирма Pall Life Sciences) применяли для оценки аффинности и pH-зависимого связывания антител к C5. Антитела, секретированные в супернатант культуры В-клеток, наносили на кончик покрытого белком А биосенсора (фирма Pall Life Sciences) и погружали в содержащий 50 нМ человеческий или обезьяний C5 MES-буфер, pH 7,4 для анализа кинетики ассоциации. Кинетику диссоциации анализировали как в MES-буфере с pH 7,4, так и в MES-буфере с pH 5,8.

В целом 41439 В-клеточных линий подвергали скринингу в отношении аффинности и pH-зависимого связывания с человеческим или обезьяньим C5 и отбирали 677 линий, которые обозначали как CFA0001-0677. РНК отобранных линий очищали из криоконсервированных клеточных дебрисов с помощью наборов ZR-96 Quick-RNA (ZYMO RESEARCH, каталожный номер R1053). ДНК, кодирующие переменные области тяжелой цепи антител отобранных линий амплифицировали с помощью ПЦР с обратной транскрипцией и осуществляли рекомбинацию с ДНК, кодирующей константную область тяжелой цепи F760G4 (SEQ ID NO: 33) или F939G4 (SEQ ID NO: 34). ДНК, кодирующие переменные области легкой цепи антител амплифицировали с помощью ПЦР с обратной транскрипцией и осуществляли рекомбинацию с ДНК, кодирующей константную область легкой цепи k0MTC (SEQ ID NO: 36). Отдельно синтезировали гены тяжелой и легкой цепи существующего гуманизированного антитела к C5, экулизумаба (EcuH-G2G4, SEQ ID NO: 29 и EcuL-k0, SEQ ID NO: 30). ДНК, кодирующую VH (EcuH, SEQ ID NO: 31) сливали в рамке считывания с ДНК, кодирующей CH модифицированного человеческого IgG4 (F760G4, SEQ ID NO: 33), а ДНК, кодирующую VL (EcuL, SEQ ID NO: 32), сливали в рамке считывания с ДНК, кодирующей константную область легкой цепи k0 (SEQ ID NO: 37). Каждую из слитых кодирующих последовательностей клонировали также в экспрессионном векторе. Антитела экспрессировали в FreeStyle™ 293-F-клетках (фирма Invitrogen) и очищали из супернатантов культур для оценки функциональной активности. Нейтрализующие активности антител оценивали путем анализа ингибирования активности комплемента с помощью анализа лизиса липосом, как описано в примере 5.1.

2.2. Группировка в зависимости от эпитопа с помощью сэндвич-ELISA.

Антитела к C5, обладающие высокой аффинностью, pH-зависимостью или нейтрализующей активностью, отбирали для дальнейшего анализа. Применяли анализ методом сэндвич-ELISA для группировки отобранных антител, связывающихся с одним и тем же или перекрывающимися эпитопами белка C5, в различные эпитопные "корзины". Немеченые "захватывающие" антитела разводили до 1 мкг/мл с использованием ЗФР(-) и добавляли в 384-луночные планшеты MAXISorp (фирма Nunc, каталожный номер 164688). Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и блокировали с помощью реагента Blocking One (фирма Nacalai Tesque, каталожный номер 03953-95), разведенного в 5 раз. Планшеты инкубировали в течение 1 ч, промывали, добавляли 2 нМ человеческий C5 и инкубировали в течение 1 ч. После инкубации планшеты промывали и добавляли меченые идентифицирующие антитела (1 мкг/мл, биотинилированные с помощью NHS-PEG4-биотина). После инкубации в течение 1 ч выявляли связывание биотинилированного антитела с помощью конъюгата стрептавидин-пероксидаза из хрена (фирма Thermo Scientific, каталожный номер 21132), для чего добавляли ABTS (фирма KPL, каталожный номер 50-66-06).

Все антитела к C5 применяли как в качестве "захватывающего" антитела, так и в качестве "идентифицирующего" антитела, и проводили всесторонний парный анализ. Как продемонстрировано на фиг. 1, взаимно конкурирующие антитела были сгруппированы в 7 эпитопных "корзин": CFA0668, CFA0334 и CFA0319 отнесены в группу эпитопа А, CFA0647, CFA0589, CFA0341, CFA0639, CFA0635, CFA0330 и CFA0318 отнесены в группу эпитопа В, CFA0538, CFA0501, CFA0599, CFA0307, CFA0366, CFA0305, CFA0675, CFA0666 и CFA0672 отнесены в группу эпитопа В, экулизумаб и CFA0322 отнесены в группу эпитопа Г, CFA0329 отнесен в группу эпитопа Е, CFA0359 и CFA0217 отнесены в группу эпитопа Е, а CFA0579, CFA0328 и CFA0272 отнесены в группу эпитопа Ж. На фиг. 1 представлена группировка в зависимости от эпитопа некоторых химерных антител к C5. Последовательности VH и VL антител к C5, входящих в группу эпитопа В, перечислены в табл. 2.

Таблица 2. Антитела, входящие в группу эпитопа В

Антитело	SEQ ID NO:							
	VH	VL	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3
CFA0305	1	11	45	55	65	75	85	95
CFA0307	2	12	46	56	66	76	86	96
CFA0366	3	13	47	57	67	77	87	97
CFA0501	4	14	48	58	68	78	88	98
CFA0538	5	15	49	59	69	79	89	99
CFA0599	6	16	50	60	70	80	90	100
CFA0666	7	17	51	61	71	81	91	101
CFA0672	8	18	52	62	72	82	92	102
CFA0675	9	19	53	63	73	83	93	103

2.3. Гуманизация и оптимизация.

Осуществляли гуманизацию переменной области некоторых антител к C5 для снижения потенци-

альной иммуногенности антител. Гипервариабельные участки (CDR) кроличьего антитела к C5 трансплантировали в гомологичные каркасные участки человеческого антитела (FR) с помощью стандартного метода трансплантации CDR (Nature 321, 1986, сс. 522-525). Синтезировали гены, кодирующие гуманизированные VH и VL, и объединяли с модифицированной CH человеческого IgG4 (SG402, SEQ ID NO: 35) и человеческой CL (SKI, SEQ ID NO: 38) соответственно, и каждую из объединенных последовательностей клонировали в экспрессионном векторе.

Анализировали большое количество мутаций и комбинаций мутаций для идентификации мутаций и комбинаций мутаций, которые улучшают связывающие свойства некоторых перспективных антител. Затем интродуцировали множество мутаций в гуманизированные вариабельные области для повышения аффинности связывания с C5 при нейтральном pH или для снижения аффинности связывания с C5 при кислом pH. Таким путем был создан на основе CFA0305 один из оптимизированных вариантов, 305LO5 (VH, SEQ ID NO: 10; VL, SEQ ID NO: 20; HVR-H1, SEQ ID NO: 54; HVR-H2, SEQ ID NO: 64; HVR-H3, SEQ ID NO: 74; HVR-L1, SEQ ID NO: 84; HVR-L2, SEQ ID NO: 94 и HVR-L3, SEQ ID NO: 104).

Антитела экспрессировали в клетках HEK293, совместно трансфектированных смесью экспрессионных векторов для тяжелой и легкой цепи, и очищали с использованием белка А.

Пример 3.

Характеризация связывания антител к C5.

3.1. Экспрессия и очистка рекомбинантных антител.

Рекомбинантные антитела временно экспрессировали, используя клетки линии FreeStyle293-F (FS293-F-клетки) (фирма Thermo Fisher, Карлсбад, шт. Калифорния, США). Очистку из кондиционированных сред, в которых происходила экспрессия антител, осуществляли с помощью стандартного метода с использованием белка А. При необходимости затем проводили гель-фильтрацию.

3.2. Оценка pH-зависимости.

Кинетические параметры антител к C5 в отношении рекомбинантного человеческого C5 оценивали при pH 7,4 и pH 5,8 при 37°C с использованием устройства BIACORE®T200 (фирма GE Healthcare). Белок ProA/G (фирма Pierce) иммобилизовали на сенсорном чипе CM4 с использованием набора для аминного сочетания (фирма GE Healthcare) в условиях, рекомендованных фирмой GE Healthcare. Антитела и аналиты разводили соответствующими подвижными буферами, ACES pH 7,4 и pH 5,8 (20мМ ACES, 150мМ NaCl, 1,2мМ CaCl₂, 0,05% Твин 20, 0,005% NaN₃). Каждое антитело "захватывали" на поверхности сенсора с помощью ProA/G. Уровни "захвата" антител, как правило, соответствовали 60-90 резонансным единицам (RU). Затем инъецировали рекомбинантный человеческий C5 в концентрациях 10 и 20 нМ или 20 и 40 нМ, после чего давали пройти диссоциации. Поверхность регенерировали с использованием 25мМ NaOH. Кинетические параметры при обоих значениях pH определяли путем аппроксимации сенсограмм на основе модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения BIACORE® T200 Evaluation, версия 2.0 (фирма GE Healthcare). Сенсограммы для всех антител представлены на фиг. 2А и 2Б. Скорость ассоциации (ka), скорость диссоциации (kd) и аффинность связывания (KD) антител представлены в табл. 3. Все антитела за исключением CFA0330 (VH, SEQ ID NO: 21 и VL, SEQ ID NO: 25) и CFA0341 (VH, SEQ ID NO: 22 и VL, SEQ ID NO: 26) характеризовались относительно более быстрой скоростью диссоциации при pH 5,8, чем при pH 7,4.

Таблица 3. Кинетические параметры антител к C5 при pH 7,4 и pH 5,8

Обозначение антитела	pH7.4			pH5.8		
	ka	kd	KD	ka	kd	KD
CFA0305	3.82E+04	5.89E-04	1.54E-08	4.27E+04	1.83E-02	4.30E-07
CFA0307	3.24E+05	2.63E-03	8.13E-09	2.04E+05	3.34E-02	1.64E-07
CFA0366	1.04E+06	9.34E-03	8.99E-09	9.35E+05	7.03E-02	7.52E-08
CFA0501	4.74E+05	1.69E-03	3.56E-09	1.50E+05	2.62E-02	1.74E-07
CFA0538	4.73E+05	1.85E-03	3.91E-09	1.22E+05	3.01E-02	2.46E-07
CFA0599	4.74E+05	2.81E-03	5.93E-09	4.54E+05	3.73E-02	8.21E-08
CFA0666	3.65E+05	6.26E-04	1.71E-09	2.82E+05	9.39E-03	3.33E-08
CFA0672	5.23E+05	1.83E-04	3.51E-10	7.11E+04	9.78E-03	1.38E-07
CFA0675	3.83E+05	4.12E-04	1.08E-09	3.89E+05	6.61E-03	1.70E-08
305-LO5	4.48E+05	2.11E-04	4.71E-10	2.03E+06	2.85E-02	1.40E-08
CFA0330	1.66E+06	2.02E-04	1.22E-10	1.22E+06	2.24E-04	1.84E-10
CFA0341	6.28E+05	9.77E-05	1.55E-10	1.24E+06	7.39E-05	5.95E-11

3.3. Оценка кросс-реактивности.

Для выявления кросс-реактивности антител к C5, а именно антител к человеческому C5 (hC5) и антител к C5 обезьян циномоглус (суноC5), осуществляли кинетический анализ BIACORE®. Анализ проводили в тех же условиях, которые описаны в примере 3.2. Рекомбинантный суноC5 инъецировали в концентрациях 2, 10 и 50 нМ. Кинетические параметры определяли, осуществляя такую же аппроксимацию данных, которая описана в примере 3.2. Результаты определения кинетических характеристик связывания и аффинности при pH 7,4 представлены в табл. 4. Кинетические параметры в отношении hC5,

указанные в табл. 4, представляют собой результаты, полученные в примере 3.2. Все антитела к C5 за исключением CFA0672 характеризовались сопоставимыми величинами KD в отношении hC5 и суноC5. KD для CFA0672 в отношении суноC5 была в 8 раз выше (более слабая аффинность), чем в отношении hC5.

Таблица 4. Кинетические характеристики связывания и аффинность антител к C5, а именно, антител к hC5 и суноC5, при pH 7,4

Обозначение антитела	Аффинность к hC5			Аффинность к суноC5		
	ka	kd	KD	ka	kd	KD
CFA0305	3.82E+04	5.89E-04	1.54E-08	1.21E+04	6.70E-04	5.54E-09
CFA0307	3.24E+05	2.63E-03	8.13E-09	2.90E+05	2.23E-03	7.68E-09
CFA0366	1.04E+06	9.34E-03	8.99E-09	5.04E+05	9.04E-03	1.79E-08
CFA0501	4.74E+05	1.69E-03	3.56E-09	2.66E+05	1.56E-03	5.88E-09
CFA0538	4.73E+05	1.85E-03	3.91E-09	3.05E+05	1.66E-03	5.44E-09
CFA0599	4.74E+05	2.81E-03	5.93E-09	5.42E+05	2.35E-03	4.33E-09
CFA0666	3.65E+05	6.26E-04	1.71E-09	3.14E+05	4.93E-04	1.57E-09
CFA0672	5.23E+05	1.83E-04	3.51E-10	6.41E+05	1.85E-03	2.88E-09
CFA0675	3.83E+05	4.12E-04	1.08E-09	2.94E+05	3.78E-04	1.29E-09

Пример 4.

Картирование эпитопов для антител к C5.

4.1. Связывание МАТ к C5 с пептидами, полученными на основе бета-цепи C5.

Моноклональные антитела (МАТ) к C5 тестировали в отношении связывания с полученными на основе бета-цепи C5 пептидами путем анализа методом вестерн-блоттинга. C5-пептиды: 19-180, 161-340, 321-500 и 481-660, слитые с GST-меткой (pGEX-4T-1, фирма GE Healthcare Life Sciences, 28-9545-49), экспрессировали в *E. coli* (DH5alpha, фирма TOYOBO, DNA-903). Содержащие *E. coli* образцы собирали после инкубации с 1мМ изопропил-бета-D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) в течение 5 ч при 37°C и центрифугировали при 20000 × g в течение 1 мин, получая дебрис. Дебрис суспендировали в растворе буфера для образца (2ME+) (фирма Wako, 191-13272) и применяли для анализа методом вестерн-блоттинга. Экспрессию каждого пептида подтверждали с использованием антитела к GST (фирма Abcam, ab9085) (фиг. 3). Стрелкой указаны слитые с GST C5-пептиды (46-49 кДа). МАТ к C5: CFA0305, CFA0307, CFA0366, CFA0501, CFA0538, CFA0599, CFA0666, CFA0672 и CFA0675 связывались с аминокислотами 19-180 C5 (фиг. 3).

4.2. Экспрессия и очистка MG1-MG2-домена (1-225) человеческого C5.

Рекомбинантный MG1-MG2-домен (SEQ ID NO: 43) бета-цепи человеческого C5 кратковременно экспрессировали, используя клетки линии FreeStyle293-F (FS293-F-клетки) (фирма Thermo Fisher, Карлсбад, шт. Калифорния, США). Кондиционированные среды, в которых происходила экспрессия MG1-MG2-домена, разводили, используя 1/2 объема, водой milliQ, после чего вносили в анионообменную колонку с Q-сефарозой FF (фирма GE healthcare, Уппсала, Швеция). Значение pH прошедшей через анионообменную колонку фракции доводили до pH 5,0 и вносили в катионообменную колонку с SP-сефарозой HP (фирма GE healthcare, Уппсала, Швеция), а затем элюировали с использованием градиента NaCl. Фракции, содержащие MG1-MG2-домен, собирали из элюента и затем подвергали гель-фильтрации на колонке с Супердекс 75 (фирма GE healthcare, Уппсала, Швеция) уравновешенной с помощью 1×3ФР. Затем фракции, содержащие MG1-MG2-домен, объединяли и хранили при -80°C.

4.3. Способность связываться с MG1-MG2-доменом.

Способность антитела к C5 связываться с MG1-MG2-доменом оценивали в тех же условиях анализа, которые описаны в примере 3.2, за исключением того, что измерения проводили только в условиях при pH 7,4. MG1-MG2-домен инъецировали в концентрациях 20 нМ и 40 нМ. Как продемонстрировано на фиг. 4, все антитела за исключением экулизумаба-F760G4 характеризовались повышением ответа в виде связывания, это свидетельствовало о том, что указанные антитела являлись связывающими MG1-MG2 агентами. Для экулизумаба-F760G4, который, как известно, представляет собой агент, связывающий альфа-цепь, не было выявлено связывания с MG1-MG2-доменом.

4.4. Связывание МАТ к C5 с пептидами, полученными из MG1-MG2-домена C5.

МАТ к C5 тестировали в отношении связывания с полученными из MG1-MG2-домена пептидами путем анализа методом вестерн-блоттинга. C5-пептиды: 33-124, 45-124, 52-124, 33-111, 33-108 и 45-111 (SEQ ID NO: 40), слитые с GST-меткой, экспрессировали в *E. coli*. Содержащие *E. coli* образцы собирали после инкубации с 1мМ ИПТГ в течение 5 ч при 37°C и центрифугировали при 20000 × g в течение 1 мин, получая дебрис. Дебрис суспендировали в растворе буфера для образца (2ME+) и применяли для анализа методом вестерн-блоттинга. Экспрессию полученных из C5 пептидов подтверждали с использованием антитела к GST (фиг. 5А). CFA0305 связывалось только с пептидом 33-124 (фиг. 5Б). CFA0305 связывалось с бета-цепью рекомбинантного человеческого C5 (rhC5) (примерно 70 кДа), которую использовали в качестве контроля. На фиг. 5В обобщены данные о взаимодействии МАТ к C5 с полученными из C5 пептидами.

4.5. Связывание МАт к С5 с мутантами С5.

Поскольку на основе анализа кристаллической структуры было предсказано, что три аминокислотных остатка в бета-цепи С5, а именно Е48, D51 и К109, участвуют в связывании С5 с МАт к С5, то МАт к С5 тестировали в отношении связывания с содержащими точечные мутации мутантами человеческого С5 путем анализа методом вестерн-блоттинга. Содержащие точечные мутации мутанты С5, в которых один из остатков Е48, D51 и К109 был заменен на аланин, экспрессировали в клетках FS293 с использованием липофекции. Культуральные среды собирали через 5 дней после осуществления липофекции и после этого использовали для вестерн-блоттинга. ДСН-ПААГ осуществляли в восстанавливающих условиях. Результаты представлены на фиг. 6. Экулизумаб связывался с альфа-цепью С5 дикого типа (WT) и тремя содержащими точечные мутации мутантами С5, в то время как антитело CFA0305 характеризовалось сильным связыванием с бета-цепью С5 WT, слабым связыванием с Е48А-мутантом С5 и отсутствием связывания с бета-цепью D51А-мутанта и К109А-мутанта С5, это свидетельствует о том, что указанные 3 аминокислотных остатка участвуют во взаимодействиях антитело/антиген. В табл. 5 представлено обобщение результатов анализа методом вестерн-блоттинга МАт к С5 (CFA0305, CFA0307, CFA0366, CFA0501, CFA0538, CFA0599, CFA0666, CFA0672 и CFA0675). МАт к С5 относятся к группе для одного и того же эпитопа Б, однако схемы связывания антител несколько различаются между собой, это позволяет предположить, что области, связывающие С5 с МАт к С5, близки друг к другу, но не являются идентичными.

Таблица 5. Обобщение данных о взаимодействии МАт к С5 с мутантами С5

	WT	E48A	D51A	K109A
экулизумаб	+	+	+	+
CFA0305	+	+	-	-
CFA0307	+	-	-	-
CFA0366	+	-	-	-
CFA0501	+	-	-	-
CFA0538	+	-	-	-
CFA0599	+	-	-	+
CFA0666	+	-	-	+
CFA0672	+	-	-	+
CFA0675	+	+	-	+

4.6. Анализ связывания антител к С5 с мутантами С5 методом BIACORE®.

Для проверки того, участвуют ли действительно остатки Е48, G51 и К109 во взаимодействиях антитело/антиген, проводили анализ связывания методом BIACORE®. Получали три мутанта С5, а именно содержащие мутации Е48А, G51А и К109А, как описано в примере 4.5. Получали образцы супернатантов культур, содержащие сверхэкспрессирующие мутант С5 клетки FS293 с концентрацией мутанта С5 40 мкг/мл. Для анализа связывания методом BIACORE® образец разводили в 10 раз подвижным буфером BIACORE® (ACES pH 7,4, 10 мг/кг БСА, 1 мг/мл карбоксиметилдекстрана) до конечной концентрации мутанта С5 в образце 4 мкг/мл.

Взаимодействия трех мутантов С5 с антителами к С5 оценивали при 37°C с помощью устройства BIACORE® T200 (фирма GE Healthcare) с использованием условий анализа, описанных в примере 3.2. Буфер ACES pH 7,4, содержащий 10 мг/мл БСА, 1 мг/мл карбоксиметилдекстрана, применяли в качестве подвижного буфера. Экулизумаб-F760G4 и 305LO5 "захватывали" на различных проточных ячейках с помощью моноклонального мышинового антитела к человеческому IgG, Fc-фрагмент специфического (фирма GE Healthcare). Проточную ячейку 1 использовали в качестве референс-поверхности. Белки С5 дикого типа и мутантов С5 инъецировали на поверхность сенсора в концентрации 4 мкг/мл для взаимодействия с "захваченными" антителами. После окончания каждого цикла анализа поверхность сенсора регенерировали с помощью 3М MgCl₂. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения Via Evaluation, версия 2.0 (фирма GE Healthcare). Кривые, полученные для проточной референс-ячейки (проточная ячейка 1), и кривые, полученные при использовании "пустых" инъекций подвижного буфера, вычитали из кривых, полученных для проточных ячеек с "захваченными" антителами.

Как продемонстрировано на фиг. 7, все три мутанта С5 могли связываться с экулизумабом, при этом профиль связывания был сопоставим с профилем связывания с С5 дикого типа. В случае 305LO5 для всех трех мутантов был получен более низкий ответ в виде связывания с 305LO5 по сравнению с С5 дикого типа. Мутации D51А и К109А снижали связывание С5 с 305LO5 до фонового уровня.

4.7. Идентификация остатков His в С5, которые участвуют в pH-зависимых взаимодействиях между антителом к С5 и С5.

Анализ кристаллической структуры выявил 3 остатка гистидина в человеческом С5, находящихся на поверхности раздела антитело/антиген. Известно, что остаток гистидина с типичным рКа, составляю-

шим примерно 6,0, участвует в рН-зависимых белок-белковых взаимодействиях (Igawa и др., *Biochim Biophys Acta* 1844(11), 2014, сс. 1943-1950). Для изучения того, участвуют ли остатки His на поверхности раздела антитело/антиген в рН-зависимых взаимодействиях между антителом к C5 и C5, проводили анализ связывания методом BIACORE®. Получали три мутанта человеческого C5 с одной His-мутацией (H70Y, H72Y и H110Y) и мутант с двойной His-мутацией (H70Y + H110Y) следующим образом: несущие одну His-мутацию мутанты, в которых один из H70, H72 и H110 заменен на тирозин, и несущий двойную His-мутацию мутант, в котором оба H70 и H110 заменены на тирозин, экспрессировали в клетках FS293 с использованием липофекции. Антигенсвязывающие свойства 305LO5, обладающего рН-зависимостью антитела к C5, в отношении His-мутантов C5 определяли с помощью модифицированного BIACORE®-анализа как описано в примере 4.6. В целом метод заключался в следующем: в BIACORE®-анализ включали дополнительную фазу диссоциации при рН 5,8 сразу после фазы диссоциации при рН 7,4 для оценки рН-зависимой диссоциации антитела и антигена из комплексов, образовавшихся при рН 7,4. Скорость диссоциации при рН 5,8 определяли путем обработки и аппроксимации данных с использованием программного обеспечения для аппроксимации кривых Scrubber 2.0 (фирма BioLogic Software).

Как продемонстрировано на фиг. 8, одна His-мутация H70 или H110 и двойная His-мутация (H70+H110) C5 не оказывали влияния на связывание C5 с 305LO5 при нейтральном рН. В то же время, одна His-мутация H72 приводила к значительному снижению связывания C5 с 305LO5. Скорости диссоциации при рН 5,8 для His-мутантов белка C5 и белка C5-wt представлены в табл. 6. Как продемонстрировано в табл. 6, C5-wt характеризовался наиболее быстрой диссоциацией от 305LO5 при рН 5,8 среди протестированных антигенов C5. Одна His-мутация H70 приводила к почти двукратному замедлению скорости диссоциации при рН 5,8, а одна His-мутация H110 приводила к небольшому замедлению скорости диссоциации при рН 5,8 по сравнению с C5-wt. Двойная His-мутация и H70, и H110, приводила к более выраженному воздействию на рН-зависимое связывание, при этом скорость диссоциации при рН 5,8 была почти в три раза меньше, чем в случае C5-wt.

Таблица 6. Величина скорости диссоциации при рН 5,8 для His-мутантов C5, связывающихся с 305LO5

Антигены	kd (1/с)
C5-wt	1.1E-2
C5-H70Y	5.3E-3
C5-H110Y	9.3E-3
C5-H70Y, H110Y	3.9E-3

Пример 5.

Активность антител к C5 в отношении ингибирования активации C5.

5.1. Ингибирование активируемого комплементом лизиса липосом МАт к C5.

МАт к C5 тестировали в отношении ингибирования активности комплемента с помощью анализа лизиса липосом. 30 мкл сыворотки здорового человека (6,7%) (фирма Biopredic, SER018) смешивали с 20 мкл разведенного МАт в 96-луночном планшете и инкубировали на шейкере в течение 30 мин при 25°C. В каждую лунку переносили липосомы, сенсibilизированные антителами к динитрофенилу (Autokit CH50, фирма Wako, 995-40801), и планшет помещали на 2 мин на шейкер при 25°C. В каждую лунку добавляли по 50 мкл раствора субстрата (Autokit CH50) и смешивали путем встряхивания в течение 2 мин при 25°C. Конечную смесь инкубировали при 37°C в течение 40 мин, а затем измеряли ОП смеси при 340 нм. Процент лизиса липосом определяли по формуле: $100 \times \frac{[ОП_{МАт} - ОП_{фон, обусловленный сывороткой и липосомами}]}{[ОП_{без МАт} - ОП_{фон, обусловленный сывороткой и липосомами}]}$. На фиг. 9А продемонстрировано, что МАт к C5 CFA0305, 0307, 0366, 0501, 0538, 0599, 0666, 0672 и 0675 ингибировали лизис липосом. Два не обладающих рН-зависимостью антитела CFA0330 и 0341 также ингибировали лизис (фиг. 9Б).

5.2. Ингибирование с помощью МАт к C5 образования C5a.

МАт к C5 тестировали в отношении образования C5a в процессе лизиса липосом для подтверждения того, что МАт к C5 ингибируют расщепление C5 с образованием C5a и C5b. Уровень C5a в супернатантах, полученных при анализе лизиса липосом, количественно оценивали с использованием набора для C5a-ELISA (фирма R&D systems, DY2037). Все МАт ингибировали образование C5a в супернатантах в зависимости от дозы (фиг. 10А и 10Б).

5.3. Ингибирование МАт к C5 активируемого комплементом гемолиза МАт к C5 тестировали в отношении ингибирования активности классического комплемента с помощью гемолитического анализа. Куриные эритроциты (cRBC) (фирма Innovative research, IC05-0810) промывали забуференным желатином/вероналом соляным раствором, содержащим 0,5мМ MgCl₂ и 0,15мМ CaCl₂ (GVB++) (фирма Boston BioProducts, IBV-300X), и после этого сенсibilизировали антителом к куриным RBC (Rockland 103-4139) в концентрации 1 мкг/мл в течение 15 мин при 4°C. Затем клетки промывали GVB++ и суспендировали в том же самом буфере из расчета 5×10^7 клеток/мл. В отдельном круглодонном 96-луночном планшете смешивали 50 мкл сыворотки здорового человека (20%) (фирма Biopredic, SER019) с 50 мкл разведенного МАт и инкубировали на шейкере при 37°C в течение 30 мин. Затем в лунки, содержащие

сыворотку, добавляли по 60 мкл суспензии сенсibilизированных cRBC и содержащую антитело смесь инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После инкубации планшет центрифугировали при 1000 × g в течение 2 мин при 4°C. Супернатанты (100 мкл) переносили в лунки плоскодонного 96-луночного планшета для микроанализа для измерений ОП при 415 нм, длина референс-волны составляла 630 нм. Процент гемолиза определяли по формуле: $100 \times [(ОП_{МАТ} - ОП_{сыворотка \text{ и } cRBC}) / ((ОП_{без МАТ} - ОП_{фон, обусловленный сывороткой \text{ и } cRBC})]$. На фиг. 11 продемонстрировано, что МАТ к C5 CFA0305 и 305LO5 ингибировали гемолиз cRBC.

5.4. Ингибирование МАТ к C5 альтернативного пути комплемента.

Гемолитический анализ в случае альтернативного пути осуществляли аналогично осуществлению гемолитического анализа в случае классического пути. Кровь, собранную у новозеландских белых кроликов (фирма InVivos), смешивали с равным объемом раствора Олсвера (фирма Sigma, A3551), и смесь применяли в качестве кроличьих RBC (rRBC). rRBC промывали с использованием GVB, дополненного 2мМ MgCl₂ и 10мМ ЭГТА, и суспендировали в том же самом буфере из расчета 7×10^8 клеток/мл. В круглодонном 96-луночном планшете для микроанализа смешивали 40 мкл сыворотки здорового человека (25%) (фирма Biopredic, SER019) с 40 мкл разведенного МАТ и инкубировали на шейкере при 37°C в течение 30 мин. Затем в лунки, содержащие сыворотку, добавляли по 20 мкл суспензии rRBC и содержащую антитело смесь инкубировали при 37°C в течение 60 мин. После инкубации планшет центрифугировали при 1000×g в течение 2 мин при 4°C. Супернатанты (70 мкл) переносили в лунки плоскодонного 96-луночного планшета для микроанализа для измерения ОП при 415 нм, длина референс-волны составляла 630 нм. На фиг. 12 продемонстрировано, что МАТ к C5 CFA0305 и CFA0672 ингибировали гемолиз rRBC, это свидетельствует о том, что указанные антитела ингибируют альтернативные пути комплемента.

Пример 6.

Оптимизация моноклональных антител к C5 (варианты антитела 305).

Большое количество мутаций вносили в оптимизированную вариabельную область антитела к C5 305LO5 для дополнительного улучшения его свойств, и создавали оптимизированные вариabельные области 305LO15, 305LO16, 305LO18, 305LO19, 305LO20, 305LO22 и 305LO23. Аминокислотные последовательности VH и VL вариантов 305 представлены в табл. 7 и 8 соответственно. Гены, кодирующие гуманизированную VH, объединяли с модифицированным вариантом CH человеческого IgG1 SG115 (SEQ ID NO: 114) и модифицированными вариантами CH человеческого IgG4 SG422 (SEQ ID NO: 115) или SG429 (SEQ ID NO: 116). Гены, кодирующие гуманизированную VL, объединяли с человеческой CL (SK1, SEQ ID NO: 38). Отдельно синтезировали гены тяжелой и легкой цепи, кодирующие гуманизированное антитело к C5 BNJ441 (BNJ441H, SEQ ID NO: 149; BNJ441L, SEQ ID NO: 150), и каждый из них клонировали в экспрессионном векторе.

Антитела экспрессировали в клетках HEK293, совместно трансфектированных комбинацией экспрессионных векторов для тяжелой и легкой цепи, и очищали с использованием белка А.

Таблица 7. Аминокислотные последовательности VH вариантов 305

Антитело	VH	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3
305LO5	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 54 SSYYVA	SEQ ID NO: 64 AIYTGSGATYKASWAKG	SEQ ID NO: 74 DGGYDYPHAMHY
305LO15	SEQ ID NO: 106	SEQ ID NO: 117 SSYYMA	SEQ ID NO: 118 AIFTGSGAEYKAEWAKG	SEQ ID NO: 121 DAGYDYPHAMHY
305LO16	SEQ ID NO: 107	SEQ ID NO: 117 SSYYMA	SEQ ID NO: 119 AIFTGSGAEYKAEWVKG	SEQ ID NO: 121 DAGYDYPHAMHY
305LO18	SEQ ID NO: 108	SEQ ID NO: 117 SSYYMA	SEQ ID NO: 118 AIFTGSGAEYKAEWAKG	SEQ ID NO: 121 DAGYDYPHAMHY
305LO19	SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 117 SSYYMA	SEQ ID NO: 118 AIFTGSGAEYKAEWAKG	SEQ ID NO: 121 DAGYDYPHAMHY
305LO20	SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 117 SSYYMA	SEQ ID NO: 118 AIFTGSGAEYKAEWAKG	SEQ ID NO: 121 DAGYDYPHAMHY
305LO22	SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 117 SSYYMA	SEQ ID NO: 118 AIFTGSGAEYKAEWAKG	SEQ ID NO: 121 DAGYDYPHAMHY
305LO23	SEQ ID NO: 110	SEQ ID NO: 117 SSYYMA	SEQ ID NO: 120 GIFTGSGATYKAEWAKG	SEQ ID NO: 121 DAGYDYPHAMHY

Таблица 8. Аминокислотные последовательности VL вариантов 305

Антитело	VL	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3
305LO5	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 84 QASQNISSSLA	SEQ ID NO: 94 GASKIHS	SEQ ID NO: 104 QSTKVGSSYGNH
305LO15	SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 122 RASQGISSSLA	SEQ ID NO: 123 GASETES	SEQ ID NO: 125 QNTKVGSSYGNT
305LO16	SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 122 RASQGISSSLA	SEQ ID NO: 123 GASETES	SEQ ID NO: 125 QNTKVGSSYGNT
305LO18	SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 122 RASQGISSSLA	SEQ ID NO: 123 GASETES	SEQ ID NO: 125 QNTKVGSSYGNT
305LO19	SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 122 RASQGISSSLA	SEQ ID NO: 123 GASETES	SEQ ID NO: 125 QNTKVGSSYGNT
305LO20	SEQ ID NO: 112	SEQ ID NO: 122 RASQGISSSLA	SEQ ID NO: 123 GASETES	SEQ ID NO: 125 QNTKVGSSYGNT
305LO22	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 122 RASQGISSSLA	SEQ ID NO: 124 GASTTQS	SEQ ID NO: 125 QNTKVGSSYGNT
305LO23	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 122 RASQGISSSLA	SEQ ID NO: 124 GASTTQS	SEQ ID NO: 125 QNTKVGSSYGNT

Пример 7.

Характеризация связывания антител к C5 (варианты 305).

Кинетические параметры антител к C5, а именно, параметры связывания с рекомбинантным человеческим C5, оценивали при 37°C с использованием устройства BIACORE® T200 (фирма GE Healthcare) при трех различных условиях: (1) и ассоциация, и диссоциация, имели место при pH 7,4, (2) и ассоциация, и диссоциация, имели место при pH 5,8, и (3) ассоциация имела место при pH 7,4, но диссоциация имела место при pH 5,8. ProA/G (фирма Pierce) иммобилизовали на сенсорном чипе CM1 с использованием набора для аминного сочетания (фирма GE Healthcare) с применением условий, рекомендованных фирмой GE Healthcare. Антитела и аналиты для условий (1) и (3) разводили в буфере ACES pH 7,4 (20мМ ACES, 150мМ NaCl, 1,2мМ CaCl₂, 0,05% Твин 20, 0,005% NaN₃), для условия (2) их разводили в буфере ACES pH 5,8 (20мМ ACES, 150мМ NaCl, 1,2мМ CaCl₂, 0,05% Твин 20, 0,005% NaN₃). Каждое антитело "захватывали" на поверхности сенсора с помощью ProA/G. Уровни "захвата" антител, как правило, соответствовали 60-90 резонансным единицам (RU). Затем инъецировали рекомбинантный человеческий C5 в концентрациях от 3 до 27 нМ или от 13,3 до 120 нМ, полученных трехкратным серийным разведением, после чего осуществляли диссоциацию. Поверхность регенерировали с использованием 25мМ NaOH. Кинетические параметры для условий (1) и (2) определяли путем аппроксимации сенсограмм на основе модели связывания 1:1, а скорость диссоциации для условия (3) определяли путем аппроксимации сенсограмм на основе модели диссоциации 1:1 для МСК с использованием программного обеспечения BIACORE® T200 Evaluation, версия 2.0 (фирма GE Healthcare). Зависимость от pH для всех антител представляли в виде отношения скоростей диссоциации для условий (2) и (1).

Скорость ассоциации (ka), скорость диссоциации (kd), аффинность связывания (KD) и зависимость от pH представлены в табл. 9. Все антитела характеризовались большей скоростью диссоциации при pH 5,8, чем при pH 7,4, а их зависимость от pH (изменение при переходе от pH 5,8 к pH 7,4) была примерно 20-кратной.

Таблица 9. Кинетические параметры вариантов антител к C5 в условиях pH 7,4 и pH 5,8

	7.4_7.4			5.8_5.8			7.4_5.8	Зависимость от pH
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)	kd (1/c)	
LO15-SG422	1.40E+06	4.19E-04	3.00E-10	1.34E+05	8.79E-03	6.57E-08	1.61E-02	21.0
LO15-SG115	1.31E+06	3.54E-04	2.70E-10	9.49E+04	8.27E-03	8.72E-08	1.67E-02	23.4
LO16-SG422	1.28E+06	4.12E-04	3.21E-10	1.09E+05	8.69E-03	7.95E-08	1.61E-02	21.1
LO18-SG422	1.36E+06	4.26E-04	3.14E-10	1.39E+05	8.65E-03	6.24E-08	1.69E-02	20.3
LO19-SG422	1.37E+06	4.76E-04	3.46E-10	1.38E+05	8.30E-03	6.00E-08	1.61E-02	17.4
LO20-SG115	1.44E+06	4.67E-04	3.24E-10	1.41E+05	8.18E-03	5.81E-08	1.61E-02	17.5
LO20-SG422	1.35E+06	4.70E-04	3.49E-10	1.36E+05	8.15E-03	5.99E-08	1.55E-02	17.3
LO22-SG115	1.46E+06	3.82E-04	2.62E-10	1.71E+05	9.30E-03	5.45E-08	1.46E-02	24.3
LO23-SG115	1.53E+06	4.23E-04	2.77E-10	1.33E+05	8.55E-03	6.41E-08	1.73E-02	20.2

Для оценки влияния pH на связывание антигена определяли аффинность связывания антител к C5 (BNJ441, экулизумаба и варианта 305) с рекомбинантным человеческим C5 при pH 7,4 и pH 5,8 при 37°C с использованием устройства BIACORE®T200 (фирма GE Healthcare). Поликлональное козье антитело к человеческому IgG (Fc) (фирма KPL, № 01-10-20) иммобилизовали на сенсорном чипе CM4 с использованием набора для аминного сочетания (фирма GE Healthcare) с учетом условий, рекомендованных производителем. Антитела и аналиты разводили либо в буфере ACES pH 7,4, либо в буфере ACES pH 5,8, содержащем 20мМ ACES, 150мМ NaCl, 1,2мМ CaCl₂, 0,05% Твин 20 и 0,005% NaN₃. Антитела "захватывали" на поверхности сенсора согласно методу, основанному на использовании антитела к Fc, уровни "захвата", как правило, соответствовали 50-80 резонансным единицам (RU). Приготавливали образцы рекомбинантного человеческого C5 путем трехкратного серийного разведения, начиная с 27 нМ для анализа в условиях pH 7,4, или с 135 нМ для анализа в условиях pH 5,8. Поверхность регенерировали с использованием 20мМ HCl, 0,01% Твин 20. Обработку данных и аппроксимацию на основе модели связы-

вания 1:1 осуществляли с использованием программного обеспечения BiaEvaluation 2.0 (фирма GE Healthcare).

Аффинности связывания (KD) BNJ441, экулизумаба и варианта 305 с рекомбинантным человеческим C5 при pH 7,4 и pH 5,8 представлены в табл. 10. Для варианта 305 отношение (KD при pH 5,8)/(KD при pH 7,4) составляло почти 800, т.е. в 8 раз больше, чем для BNJ441, для которого отношение (KD при pH 5,8)/(KD при pH 7,4) составляло лишь 93.

Таблица 10

Антитело	KD (M)		Отношение KD при pH 5,8/pH 7,4
	pH 7.4	pH 5.8	
вариант 305LO5	1.66E-10	1.32E-07	795
экулизумаб	1.42E-10	2.64E-09	19
BNJ441	1.38E-09	1.28E-07	93

Пример 8.

Активность антител к C5 (вариантов 305) в отношении активации C5.

8.1. Ингибирование МАт к C5 активируемого комплементом лизиса липосом.

МАт к C5 тестировали в отношении ингибирования активности комплемента с помощью анализа лизиса липосом. 30 мкл сыворотки здорового человека (6,7%) (фирма Biopredic, SER019) смешивали с 20 мкл разведенного МАт в 96-луночном планшете и инкубировали на шейкере в течение 30 мин при комнатной температуре. В каждую лунку переносили липосомы, сенсibilизированные антителами к динитрофенилу (Autokit CH50, фирма Wako, 995-40801) и планшет помещали на 2 мин на шейкер при 37°C. В каждую лунку добавляли по 50 мкл раствора субстрата (Autokit CH50) и смешивали путем встряхивания в течение 2 мин при 37°C. Конечную смесь инкубировали при 37°C в течение 40 мин, а затем измеряли ОП смеси при 340 нм. Процент лизиса липосом определяли по формуле $100 \times [(ОП_{МАТ} - ОП_{фон, обусловленный сывороткой и липосомами}) / ((ОП_{без МАТ} - ОП_{фон, обусловленный сывороткой и липосомами}))]$. На фиг. 13 продемонстрировано, что МАт к C5 305LO15-SG422, 305LO16-SG422, 305LO18-SG422, 305LO19-SG422, 305LO20-SG422 и 305LO20-SG115 ингибировали лизис липосом. Два антитела с вариантами Fc 305LO15-SG115 и 305LO23-SG429 также ингибировали лизис липосом (фиг. 14).

МАт к C5 тестировали в отношении ингибирования рекомбинантного человеческого C5 (SEQ ID NO: 39). Смешивали 10 мкл человеческой сыворотки с дефицитом C5 (фирма Sigma, C1163) с 20 мкл разведенного МАт и 20 мкл рекомбинантного C5 (0,1 мкг/мл) в 96-луночном планшете и инкубировали на шейкере в течение 1 ч при 37°C. В каждую лунку переносили липосомы (Autokit CH50) и помещали на шейкер на 2 мин при 37°C. В каждую лунку добавляли по 50 мкл раствора субстрата (Autokit CH50) и смешивали путем встряхивания в течение 2 мин при 37°C. Конечную смесь инкубировали при 37°C в течение 180 мин и затем измеряли ОП при 340 нм. Процент лизиса липосом определяли согласно указанной выше процедуре. На фиг. 15 продемонстрировано, что МАт к C5 305LO22-SG115, 305LO22-SG422, 305LO23-SG115 и 305LO23-SG422 ингибировали лизис липосом.

8.2. Ингибирование с помощью МАт к C5 образования C5a.

МАт к C5 тестировали в отношении их воздействия на образование C5a в процессе лизиса липосом для подтверждения того, что МАт к C5 ингибируют расщепление C5 с образованием C5a и C5b. Уровни C5a в супернатантах, полученных при анализе лизиса липосом, количественно оценивали с использованием набора для ELISA для C5a (фирма R&D systems, DY2037). Все МАт ингибировали образование C5a в супернатантах в зависимости от дозы (фиг. 16 и 17).

8.3. Измерение активности комплемента в плазме обезьян циномоглус.

МАт к C5 тестировали в отношении ингибирования активности комплемента в плазме обезьян циномоглус. МАт к C5 вводили обезьянам (20 мг/кг) и периодически собирали образцы плазмы вплоть до дня 56. Куриные эритроциты (cRBC) (фирма Innovative research, IC05-0810) промывали забуференным желатином/вероналом соляным раствором, содержащим 0,5мМ MgCl₂ и 0,15мМ CaCl₂ (GVB++) (фирма Boston BioProducts, IBV-300X), и после этого сенсibilизировали антителом к куриным RBC (Rockland 103-4139) в концентрации 1 мкг/мл в течение 15 мин при 4°C. Затем клетки промывали GVB++ и суспендировали в том же самом буфере из расчета 1×10^8 клеток/мл. В отдельном круглодонном 96-луночном планшете для микроанализа инкубировали плазму обезьян с сенсibilизированными cRBC при 37°C в течение 20 мин. После инкубации планшет центрифугировали при $1000 \times g$ в течение 2 мин при 4°C. Супернатанты переносили в лунки плоскодонных 96-луночных планшетов для микроанализа для измерений ОП при 415 нм, длина референс-волны составляла 630 нм. Процент гемолиза определяли по формуле: $100 \times [(ОП_{после введения} - ОП_{фон, обусловленный плазмой и cRBC}) / ((ОП_{до введения} - ОП_{фон, обусловленный плазмой и cRBC}))]$. На фиг. 18 продемонстрировано, что МАт к C5 305LO15-SG422, 305LO15-SG115, 305LO16-SG422, 305LO18-SG422, 305LO19-SG422, 305LO20-SG422, 305LO20-SG115 и 305LO23-SG115 ингибировали активность комплемента в плазме.

8.4. Ингибирование с помощью МАт к C5 биологической активности вариантов C5.

МАт к C5 тестировали в отношении ингибирования следующих вариантов рекомбинантного человеческого C5: V145I, R449G, V802I, R885H, R928Q, D966Y, S1310N и E1437D. Известно, что пациенты с

PNH, которые имеют мутацию R885H в C5, дают слабый ответ на экулизумаб (см., например, Nishimura и др., *New Engl. J. Med.* 370, 2014, сс. 632-639). Каждый из вариантов человеческого C5 экспрессировали в клетках FS293 и супернатанты использовали в описанном ниже исследовании. Смешивали 10 мкл человеческой сыворотки с дефицитом C5 (фирма Sigma, C1163) с 20 мкл разведенного МАТ и 20 мкл среды для культуры клеток, содержащей вариант рекомбинантного C5 (2-3 мкг/мл), в 96-луночном планшете и инкубировали на шейкере в течение 0,5 ч при 37°C. В каждую лунку переносили липосомы (Autokit CH50) и помещали на шейкер на 2 мин при 37°C. В каждую лунку добавляли по 50 мкл раствора субстрата (Autokit CH50) и смешивали путем встряхивания в течение 2 мин при 37°C. Конечную смесь инкубировали при 37°C в течение 90 мин и затем измеряли ОП при 340 нм. Процент лизиса липосом определяли согласно описанной выше процедуре. На фиг. 19 продемонстрировано, что МАТ к C5 (экулизумаб) не ингибировало R885H-вариант C5, но ингибировало другие протестированные варианты. На фиг. 20 продемонстрировано, что МАТ к C5 (вариант 305) ингибировало все протестированные варианты C5.

8.5. Ингибирование с помощью МАТ к C5 активируемого компонентом лизиса липосом.

МАТ к C5 тестировали в отношении ингибирования активности компонента с помощью анализа лизиса липосом. Смешивали 30 мкл сыворотки здорового человека (6,7%) (фирма Biopredic, SER019) с 20 мкл разведенного МАТ в 96-луночном планшете на шейкере в течение 30 мин при комнатной температуре. В каждую лунку переносили раствор липосом, сенсibilизированных антителами к динитрофенилу (Autokit CH50, фирма Wako, 995-40801) и помещали на шейкер на 2 мин при 25°C. В каждую лунку добавляли по 50 мкл раствора субстрата (Autokit CH50) и смешивали путем встряхивания в течение 2 мин при 25°C. Конечную смесь инкубировали при 37°C в течение 45 мин и затем измеряли ОП при 340 нм. Процент ингибирования лизиса липосом определяли по формуле $100 \times [(ОП_{МАТ} - ОП_{фон, обусловленный сывороткой и липосомами}) / (ОП_{без МАТ} - ОП_{фон, обусловленный сывороткой и липосомами})]$. На фиг. 21 продемонстрировано, что МАТ к C5 BNJ441 и вариант 305 ингибировали лизис липосом, и что вариант 305 обладал более сильной ингибирующей активностью, чем BN441.

Пример 9.

Рентгенографический анализ кристаллической структуры комплекса, содержащего Fab варианта 305 и MG1-домен человеческого C5.

9.1. Экспрессия и очистка MG1-домена (20-124) человеческого C5.

Домен MG1 (аминокислотные остатки 20-124 SEQ ID NO: 39), слитый с GST-меткой посредством расщепляемого тромбином линкера (GST-MG1), экспрессировали в штамме *E. coli* BL21 DE3 pLysS (фирма Promega) с использованием вектора pGEX-4T-1 (фирма GE healthcare). Экспрессию белка индуцировали с использованием 0,1 мМ изопропил-бета-D-1-тиогаляктопиранозид (ИПТГ) при 25°C в течение 5 ч. Дебрис бактериальных клеток лизировали с использованием реагента Bugbuster (фирма Merck), дополненного лизоназой (фирма Merck) и полным коктейлем ингибиторов протеаз (фирма Roche), после чего осуществляли очистку GST-MG1 из растворимой фракции с использованием колонки GSTrap (фирма GE healthcare) согласно инструкциям производителя. GST-метку отщепляли тромбином (фирма Sigma) и полученный MG1-домен подвергали дальнейшей очистке на колонке для гель-фильтрации с Superdex 75 (фирма GE healthcare). Объединяли фракции, содержащие MG1-домен, и хранили при -80°C.

9.2. Получение Fab-фрагмента варианта 305.

Fab-фрагменты одного из оптимизированных вариантов 305 получали с помощью стандартного метода с использованием ограниченного расщепления папаином (фирма Roche Diagnostics, каталожный номер 1047825), после чего вносили в колонку с белком А (MabSlect SuRe, фирма GE Healthcare) для удаления Fc-фрагментов, катионообменную колонку (HiTrap SP HP, фирма GE Healthcare) и колонку для гель-фильтрации (Superdex 200 16/60, фирма GE Healthcare). Объединяли фракции, содержащие Fab-фрагмент, и хранили при -80°C.

9.3. Получение комплекса, содержащего Fab варианта 305 и MG1-домен человеческого C5.

Очищенный MG1-домен рекомбинантного человеческого C5 смешивали с очищенным Fab-фрагментом варианта 305 в молярном соотношении 1:1. Комплекс очищали с помощью гель-фильтрации (Superdex 200 Increase 10/300, фирма GE Healthcare) с использованием колонки, уравновешенной 25мМ HEPES pH7,5, 100мМ NaCl.

9.4. Кристаллизация.

Очищенные комплексы концентрировали до примерно 10 мг/мл и осуществляли кристаллизацию методом диффузии паров в варианте "сидящей" капли в комбинации с методом затравки при 4°C. Раствор в резервуаре состоял из 0,2М формиата магния, 15,0% (мас./об.) полиэтиленгликоля 3350. Таким путем через несколько дней получали пластинчатые кристаллы. Кристаллы пропитывали раствором, содержащим 0,2М дегидрата формиата магния, 25,0% (мас./об.) полиэтиленгликоля 3350 и 20% глицерина.

9.5. Сбор данных и определение структуры.

Данные о дифракции рентгеновских лучей получали с помощью устройства BL32XU на синхротроне SPring-8. В процессе измерений кристалл постоянно находился в потоке азота при -178°C для поддержания его в замороженном состоянии, и с использованием MX-225HS CCD-детектора (RAYONIX), помещенного на оси пучка, получали, осуществляя каждый раз поворот кристалла на 1,0°, в общей сложности 180 картин дифракции рентгеновских лучей. Определение параметров элементарных ячеек, индекса-

цию дифракционных пятен и обработку данных о дифракции, полученных из картин дифракции, осуществляли с использованием программы Xia2 (J. Appl. Cryst. 43, 2010, сс. 186-190), пакета программ XDS (Acta Cryst. D66, 2010, сс. 125-132) и Scala (Acta Cryst. D62, 2006, сс. 72-82) и в итоге получали данные о дифракционной интенсивности с разрешением вплоть до 2,11 Å. Результаты статистической обработки кристаллографических данных представлены в табл. 11.

Таблица 11. Собранные рентгенографические данные и уточненные статистические данные

Собранные данные	<i>P1</i>
пространственная группа	
элементарная ячейка	
a, b, c (Å)	39.79, 55.10, 127.76
α , β , γ (°)	89.18, 86.24, 78.20
разрешение (Å)	49.49–2.11
полные отражения	112,102
уникальные отражения	56,154
полнота (оболочка максим. разрешения) (%)	92.1 (95.8)
R_{merge}^a (оболочка максим. разрешения) (%)	7.2 (31.7)
Уточнение	
разрешение (Å)	25.00–2.11
отражения	53,398
R_{factor}^b (R_{free}^b) (%)	20.42 (26.44)
С.К.О.-отклонение от идеального	
длины связей (Å)	0.0088
углы связей (°)	1.3441

а) $R_{\text{merge}} = \frac{\sum hkl \sum j |I_j(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum hkl \sum j I_j(hkl)}$, где $I_j(hkl)$ и $\langle I(hkl) \rangle$ обозначают интенсивность измеряемого параметра j и среднюю интенсивность отражения с индексом hkl соответственно

б) фактор $R = \frac{\sum hkl |F_{\text{calc}}(hkl)| - |F_{\text{obs}}(hkl)|}{\sum hkl |F_{\text{obs}}(hkl)|}$, где F_{obs} и F_{calc} обозначают измеренные и рассчитанные амплитуды структурного фактора соответственно

в) R_{free} рассчитывали с использованием 5% отражений, отобранных случайным образом

Структуру определяли методом молекулярного замещения с использованием программы Phaser (J. Appl. Cryst. 40, 2007, сс. 658-674). Поискую (стартовую) модель Fab-домена получали на основе опубликованной кристаллической структуры Fab IgG4 (PDB код: 1BBJ), а стартовую модель MG1-домена получали на основе опубликованной кристаллической структуры человеческого C5 (PDB код: 3CU7, Nat. Immunol. 9, 2008, сс. 753-760). Модель строили с использованием программы Coot (Acta Cryst. D66, 2010, сс. 486-501) и уточняли с использованием программы Refmac5 (Acta Cryst. D67, 2011, сс. 355-367). Кристаллографический фактор достоверности (R) для данных о дифракционной интенсивности при разрешении 25-2.11 Å составлял 20,42%, при этом величина Free R составляла 26,44%. Уточненные статистические данные о структуре представлены в табл. 11.

9.6. Общая структура комплекса, содержащего Fab варианта 305 и MG1-домент C5.

Fab-фрагмент оптимизированного варианта 305 ("305 Fab"), связанный с MG1-доменом человеческого C5 ("MG1") в соотношении 1:1, и асимметричная элементарная ячейка кристаллической структуры, содержащая два комплекса, а именно, молекулы 1 и 2, представлены на фиг. 22А. Молекулы 1 и 2 оказалось возможным хорошо совместить друг с другом с величиной среднеквадратичного отклонения (С.К.О.), составляющей 0,717 Å, в положении альфа-атома С во всех остатках, как продемонстрировано на фиг. 22Б. Описанные ниже чертежи получали с использованием молекулы 1.

На фиг. 23А и 23Б картирован эпипот для контактной области 305 Fab в аминокислотной последовательности и кристаллической структуре MG1 соответственно. Эпипот включает аминокислотный остаток в MG1, который содержит один или несколько атомов, находящихся на расстоянии до 4,5 Å от любой части 305 Fab в кристаллической структуре. Кроме того, на фиг. 23А выделен эпипот, находящийся в пределах 3,0 Å.

9.7. Взаимодействия с E48, D51 и K109.

Как описано в примерах 4.5 и 4.6, МАт к C5, которые включали антитела серии 305, тестировали в отношении связывания с тремя содержащими точечные мутации E48A, D51A и K109A мутантами человеческого C5, с помощью анализов связывания методами вестерн-блоттинга и BIACORE®. В то время как варианты 305 характеризовались сильным связыванием с C5 WT, для них было выявлено лишь слабое связывание с E48A-мутантом C5 и отсутствие связывания с D51A- и K109A-мутантами. Анализ кристаллической структуры комплекса, содержащего 305 Fab и MG1, позволил установить, что все три ами-

ноокислоты E48, D51 и K109 находятся на расстоянии до 3,0 Å от 305 Fab, образуя многочисленные водородные связи с Fab, как продемонстрировано на фиг. 24А. При более подробном исследовании было установлено, что остаток K109 MG1 находится в бороздке, образованной на поверхности раздела между MG1 и тяжелой цепью Fab и тесно связан с Fab тремя водородными связями с H-CDR3_G97, H-CDR3_Y100 и H-CDR_T100b, и соляным мостиком с H-CDR3_D95 (фиг. 24Г). D51 находится между MG1 и тяжелой цепью 305 Fab и связан двумя водородными связями с H-CDR1_Ser32 и H-CDR2_Ser54, заполняя тем самым пространство (фиг. 24В). Это свидетельствует о том, что оба остатка, и K109 и D51, C5 являются остатками, имеющими решающее значение для связывания антител серии 305. С другой стороны, E48 расположен ближе к поверхности и связан лишь одной водородной связью с Fab, это позволяет предположить, что его вклад в связывание антитела должно быть меньше, чем вклад K109 и E51 (фиг. 24Б). Указанные взаимосвязи согласуются с результатами анализов связывания с помощью методов вестерн-блоттинга и BIACORE® мутантов человеческого C5 (примеры 4.5 и 4.6). Дополнительное замечание: нумерация остатков аминокислот Fab основана на схеме нумерации Кэбота (Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991).

9.8. Взаимодействия между H70, H72 и H110 человеческого C5 и антителами серии 305.

Анализ кристаллической структуры позволил установить, что три остатка гистидина в человеческом C5, а именно, H70, H72 и H110, входят в эпитоп для Fab варианта 305, что проиллюстрировано на фиг. 23А и фиг. 25А. Осуществляли анализ связывания методом BIACORE® для изучения вклада этих остатков гистидина в рН-зависимое белок-белковое взаимодействие между человеческим C5 и Fab варианта 305 с использованием H70Y-, H72Y-, H110Y- и H70Y+H110Y-мутантов человеческого C5 (пример 4.7). Мутация H72Y приводила к полному устранению связывания Fab варианта 305 с C5. Указанный остаток в C5 находится в кармане, образованном CDR2-петлей в тяжелой цепи 305 Fab и петлей в MG1 (L73, S74 и E76), плотно заполняет это пространство, что проиллюстрировано на фиг. 25В. Кроме того, остаток H72 в C5 связан водородной связью с H-CDR2_Y58. Не следует ожидать, что мутация H72Y будет допустимой, поскольку не имеется достаточного пространства для включения имеющей большой объем боковой цепи тирозина. Водородная связь с H-CDR2_Y58 также не может сохраняться. Касательно вклада H70 и H110 в рН-зависимость, мутации H70Y и H110Y приводят к более медленному отделению в результате диссоциации Fab варианта 305 от C5 при рН 5,8. H70 образует внутримолекулярную водородную связь с T53 MG1, которая, как предполагается, должна разрушаться при рН 5,8, когда протонирование H70 в C5 вызывает конформационное изменение в соответствующем участке участвующей во взаимодействии поверхности раздела MG1 (фиг. 25Б). Для H110 следует ожидать, что протонирование этого остатка в C5 должно вызывать отталкивание зарядов от 305 Fab, которое может быть усилено в результате протонирования соседнего остатка гистидина, H-CDR3_H100c (фиг. 25Г).

Хотя выше изобретение описано для лучшего понимания с указанием некоторых деталей с целью иллюстрации и примеров, описание и примеры не должны рассматриваться в качестве ограничивающих объем изобретения. Описание всей патентной и научной литературы, процитированной в настоящем описании, специально полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения анти-C5 антитела с более высокой аффинностью при рН 7,4, чем при рН 5,8, включающий

иммунизацию животного, не являющегося человеком, против полипептида, где полипептид включает область, соответствующую аминокислотам в положениях 33-124 бета-цепи C5 (SEQ ID NO: 40),

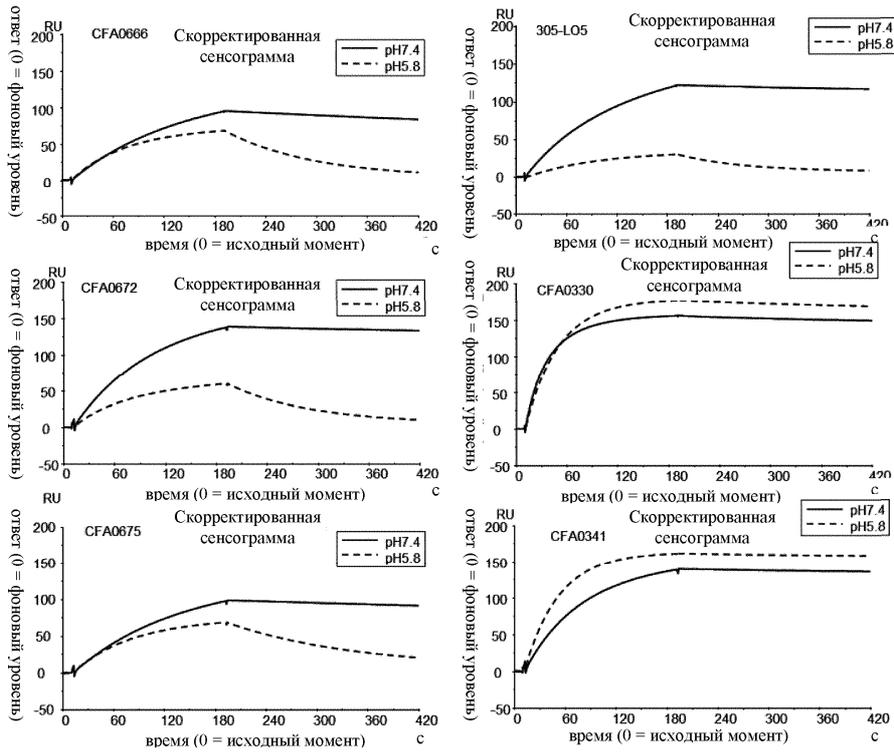
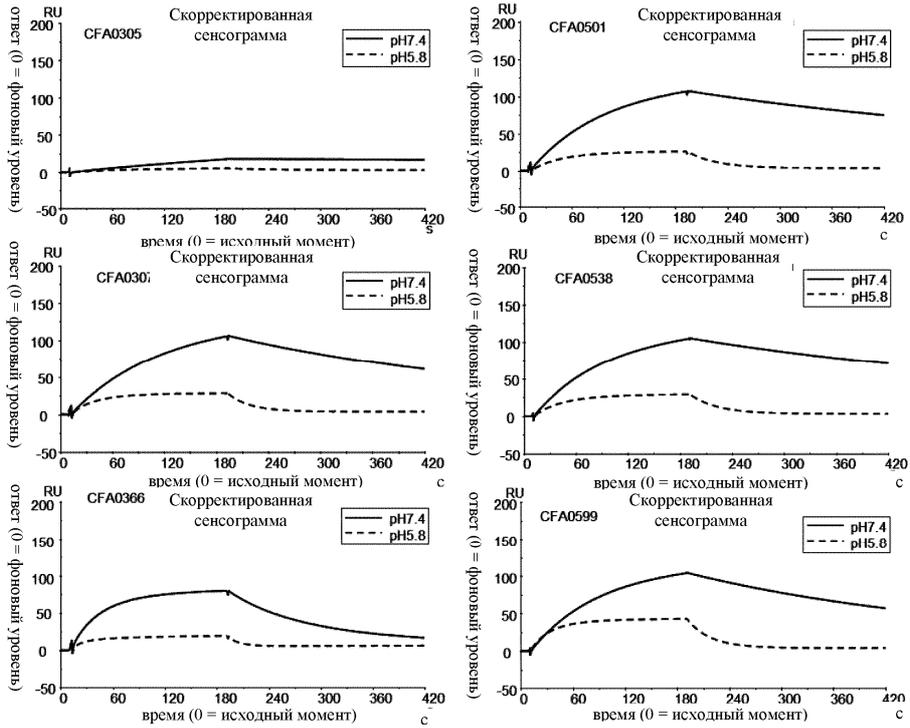
выделение нуклеиновой кислоты, кодирующей анти-C5 антитело, и культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, где анти-C5 антитело связывается с эпитопом, содержащим по меньшей мере один фрагмент, выбранный из группы, состоящей из аминокислот 47-57, 70-76 и 107-110 бета-цепи C5.

2. Способ получения анти-C5 антитела с более высокой аффинностью при рН 7,4, чем при рН 5,8, включающий иммунизацию животного, не являющегося человеком, против полипептида, где полипептид включает по меньшей мере один фрагмент, выбранный из аминокислот 47-57, 70-76 и 107-110 бета-цепи C5 (SEQ ID NO: 40), выделение нуклеиновой кислоты, кодирующей анти-C5 антитело, и культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, где анти-C5 антитело связывается по меньшей мере один указанный фрагмент.

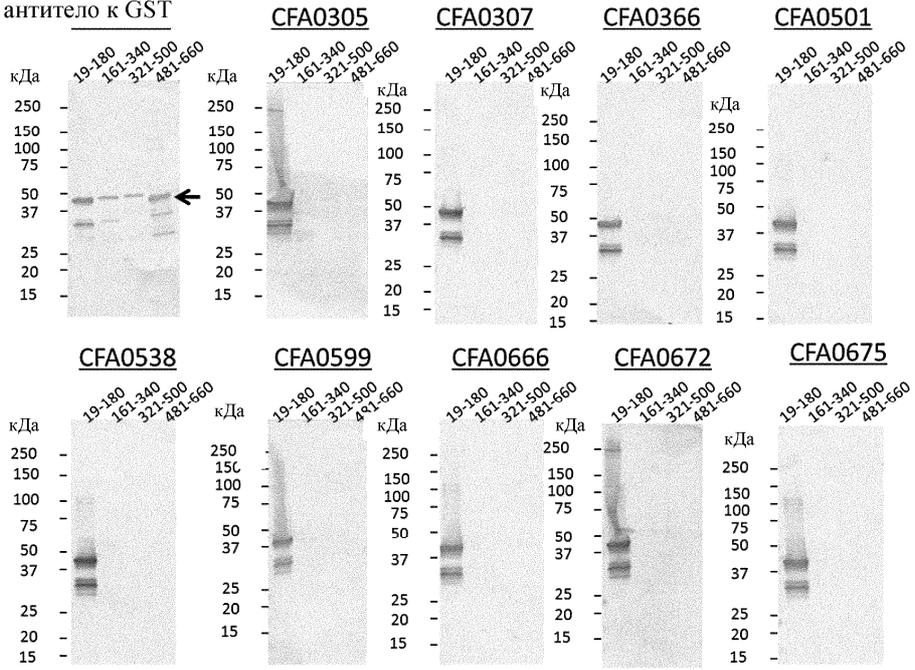
3. Способ по п.1 или 2, где полипептид включает по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из Glu48, Asp51, His70, His72, Lys109 и His110, где анти-C5 антитело связывается по меньшей мере с одной аминокислотой с более высокой аффинностью при рН 7,4, чем при рН 5,8.

4. Способ по п.3, где полипептид включает His70, His72, и His110, где анти-C5 антитело связывается с His70, His72 и His110 с более высокой аффинностью при рН 7,4, чем при рН 5,8.

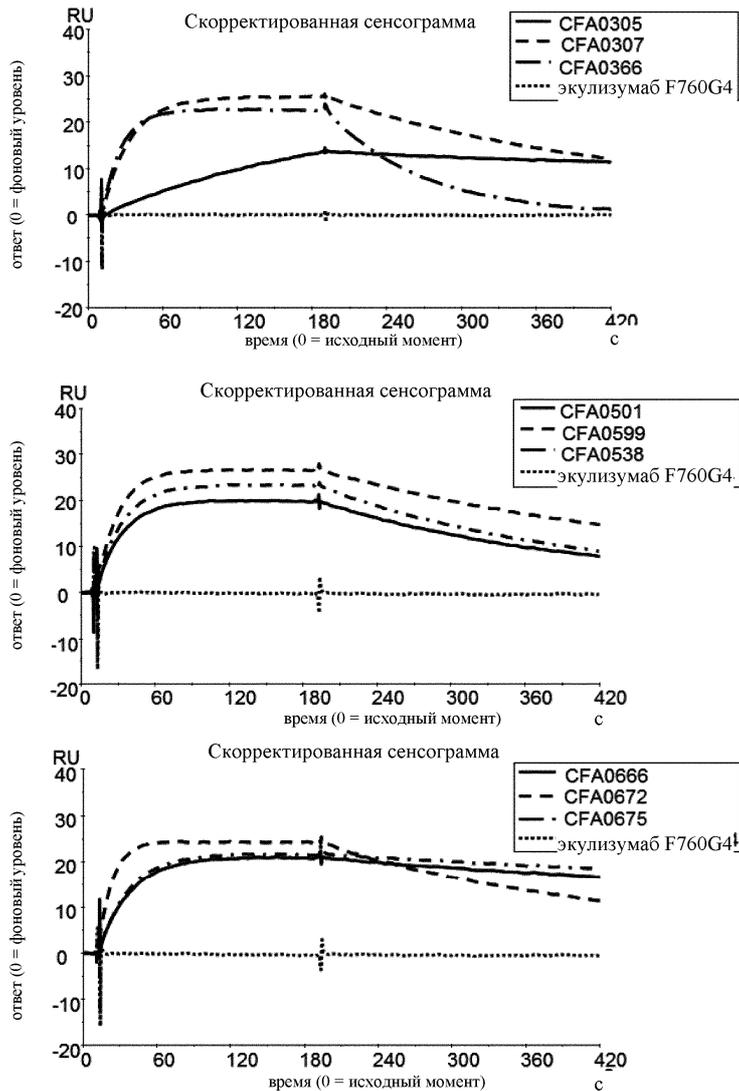
5. Способ по любому из пп.1, 2, где анти-C5 антитело может конкурировать за связывание C5 с эпитопом или связывается с тем же самым эпитопом, что и антитело, содержащее пару VH и VL, выбранную из:



антитело к GST

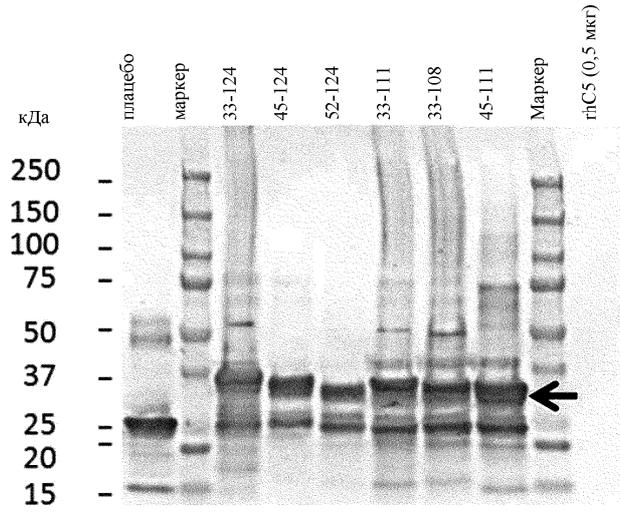


Фиг. 3



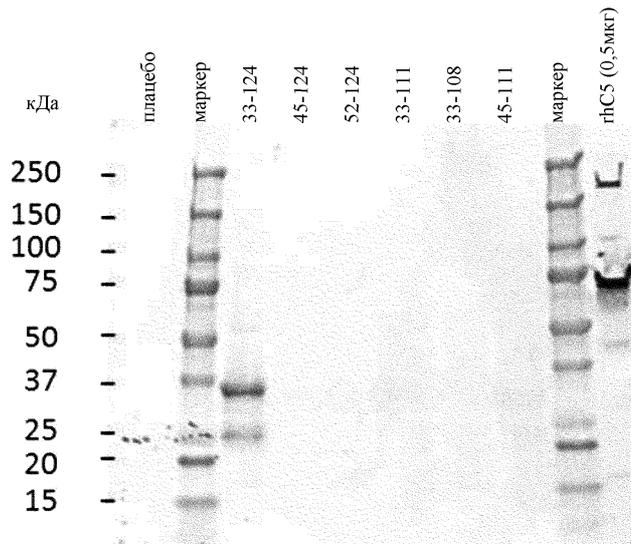
Фиг. 4

Антитело к GST



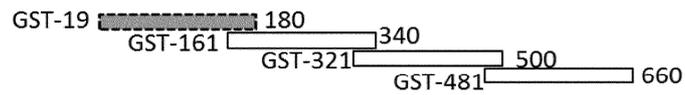
Фиг. 5А

CFA0305

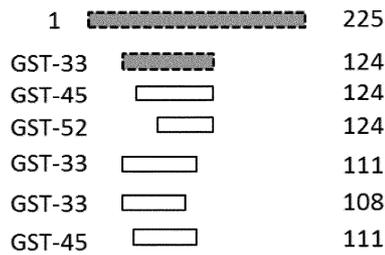


Фиг. 5Б

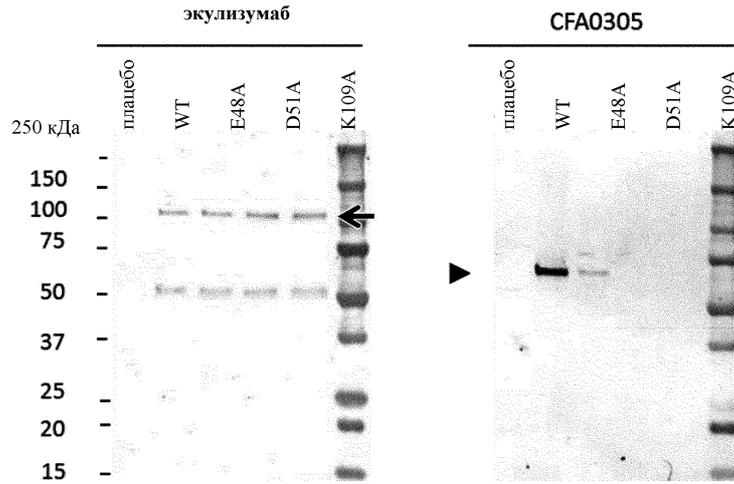
1 Бета-цепь человеческого C5 660



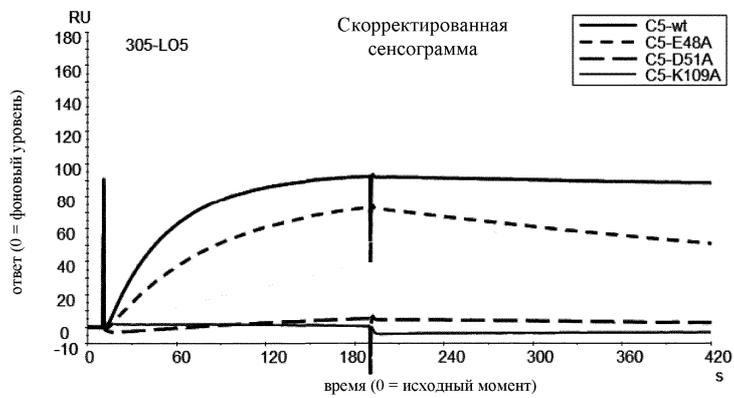
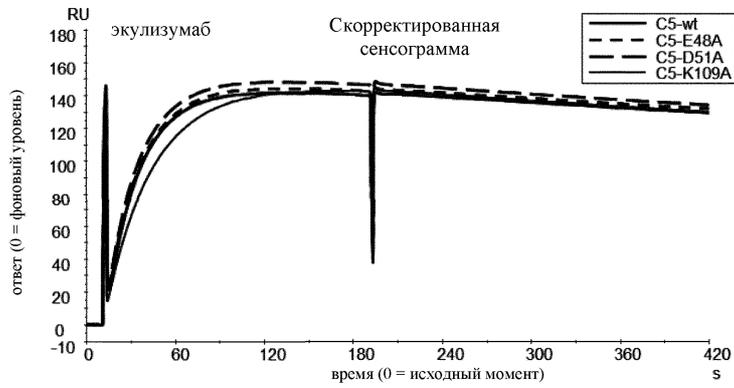
MG1-MG2-домен



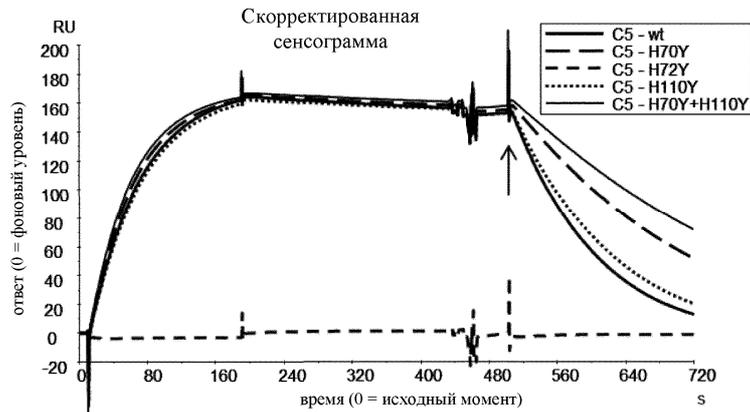
Фиг. 5В



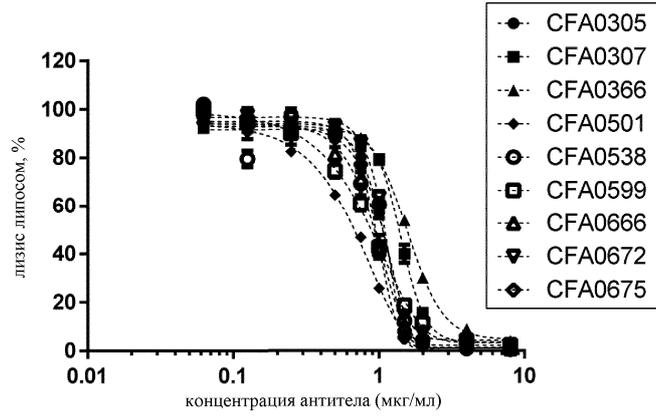
Фиг. 6



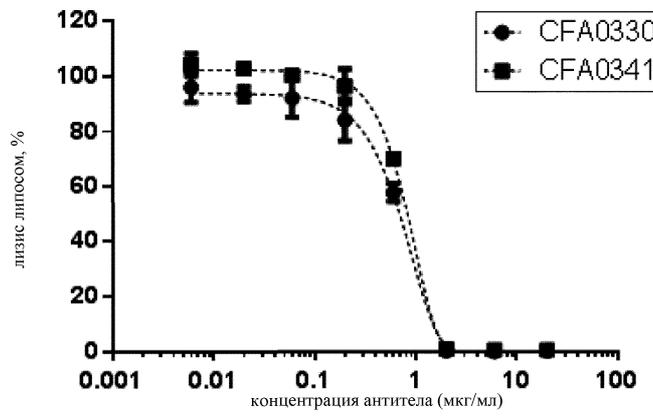
Фиг. 7



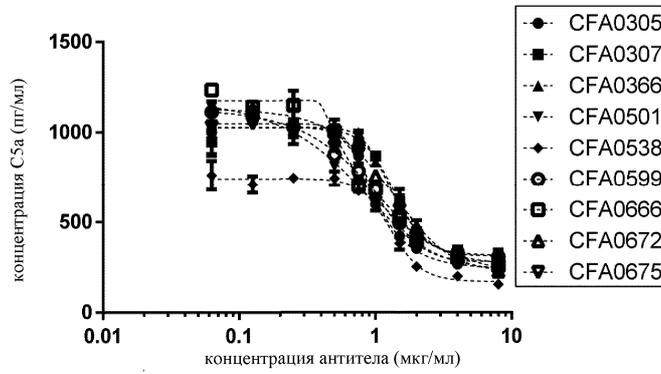
Фиг. 8



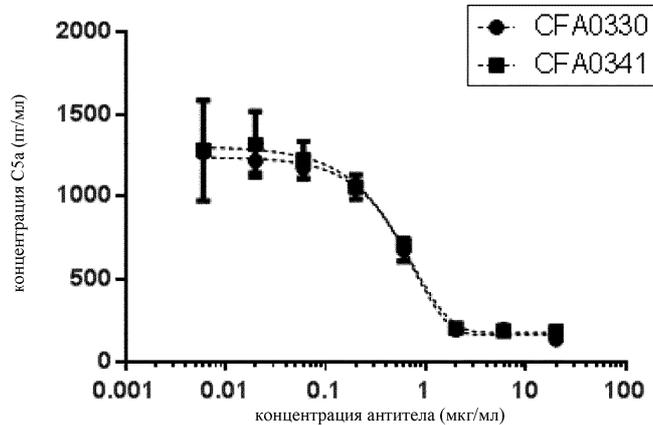
Фиг. 9А



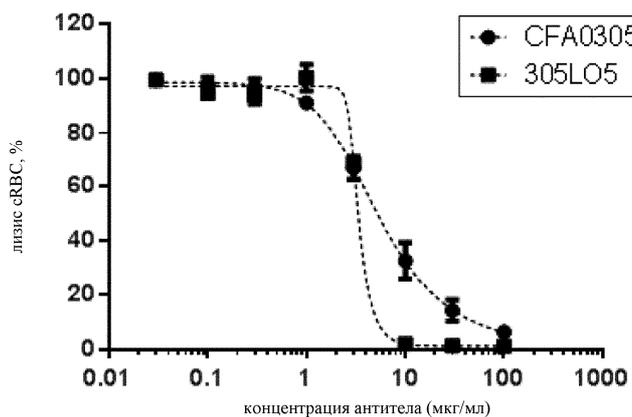
Фиг. 9Б



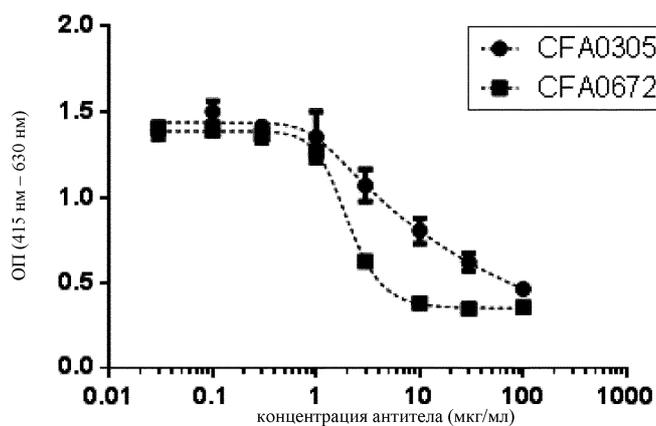
Фиг. 10А



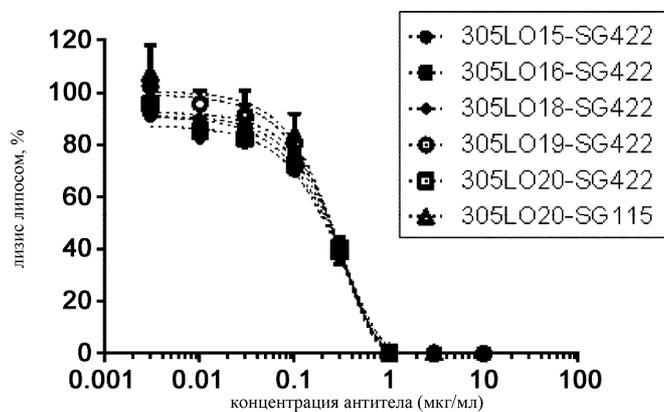
Фиг. 10Б



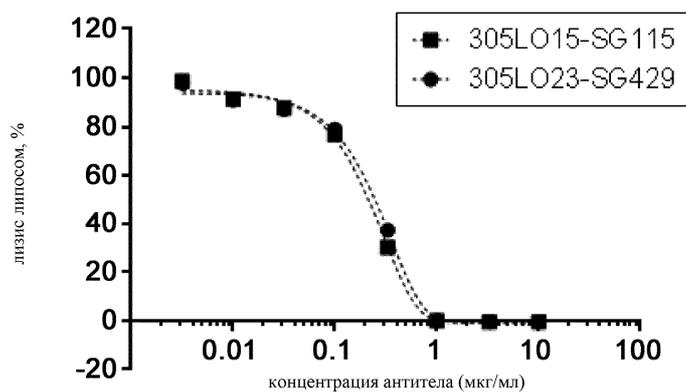
Фиг. 11



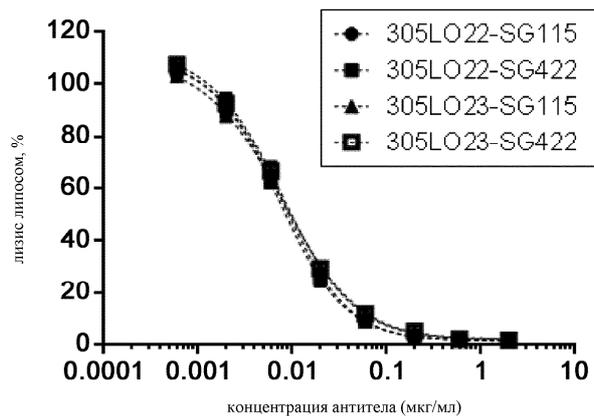
Фиг. 12



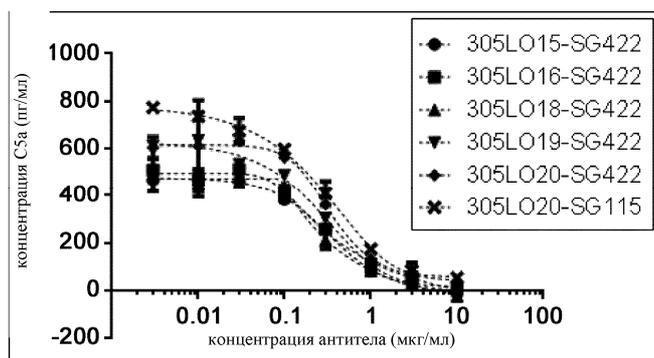
Фиг. 13



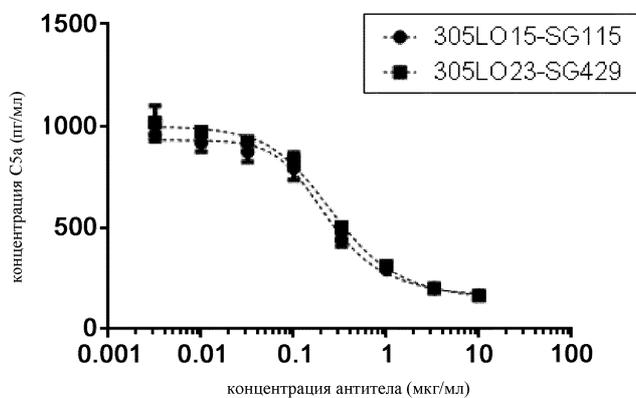
Фиг. 14



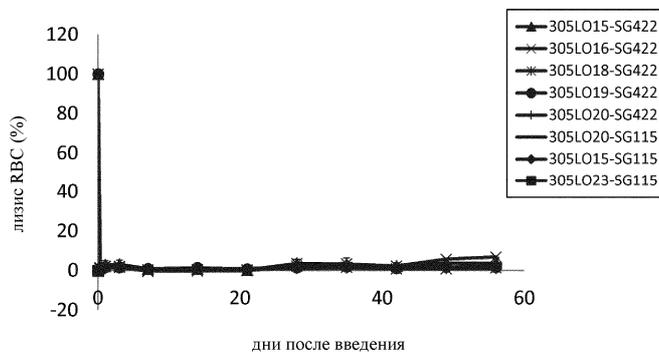
Фиг. 15



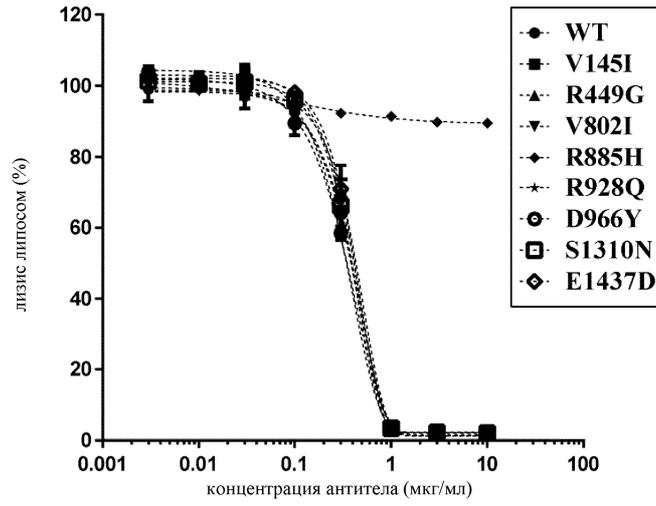
Фиг. 16



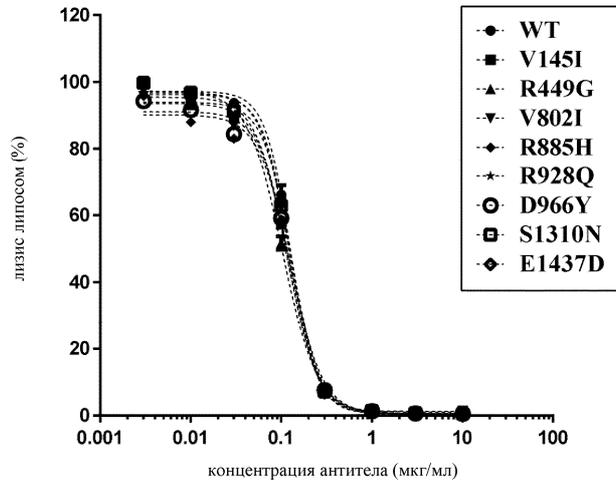
Фиг. 17



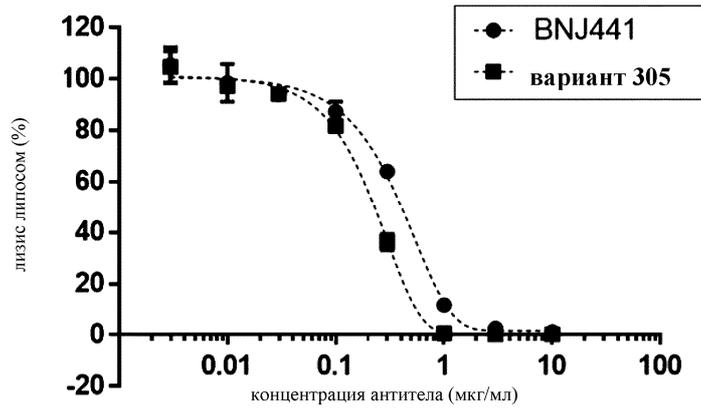
Фиг. 18



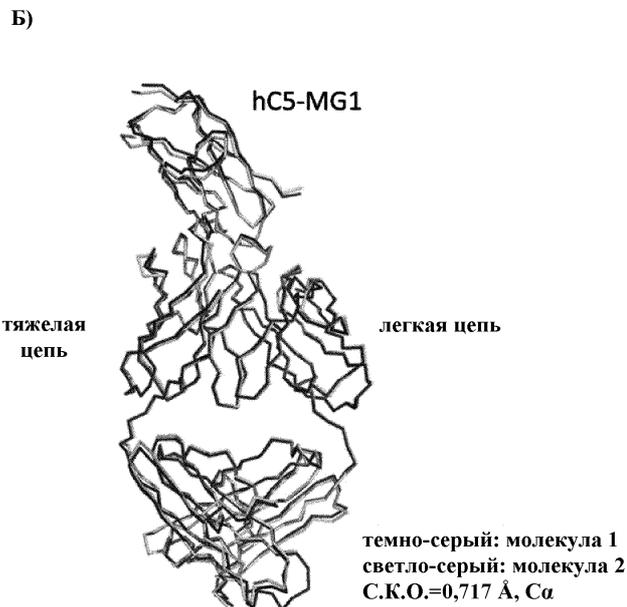
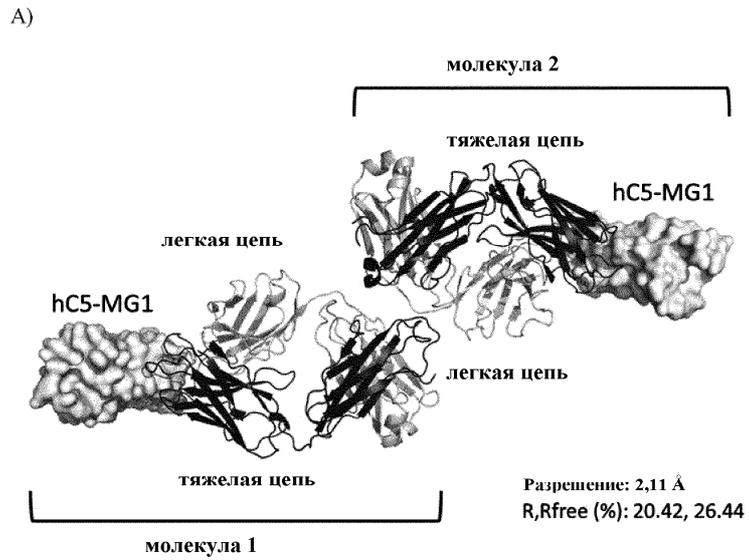
Фиг. 19



Фиг. 20



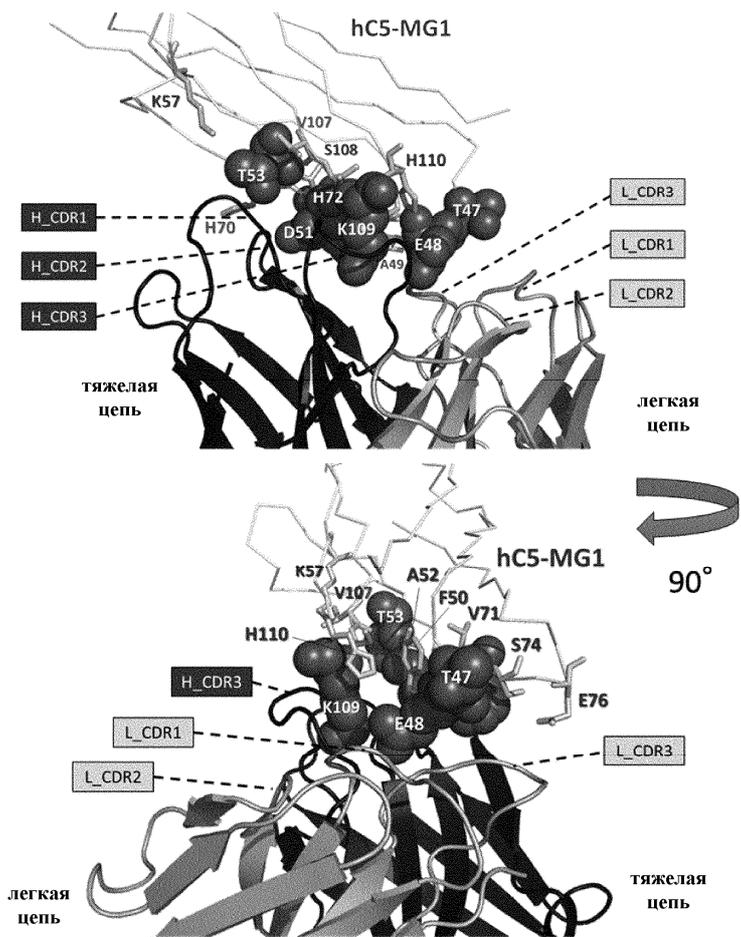
Фиг. 21



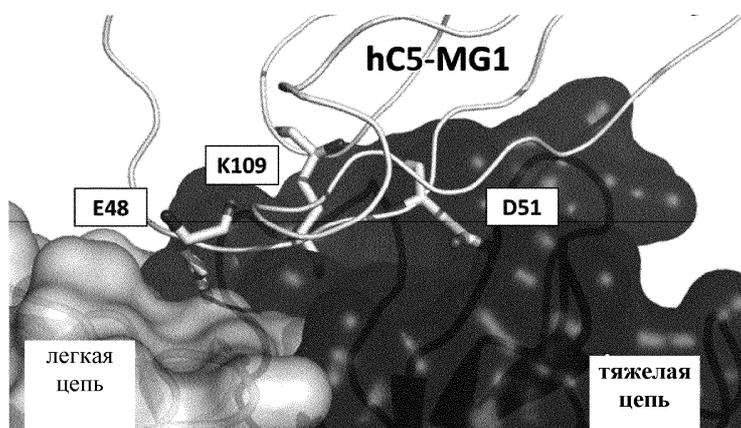
Фиг. 22

MG1-домен hC5 (20-124)																													
2										3										4									
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
E	Q	T	Y	V	I	S	A	P	K	I	F	R	V	G	A	S	E	N	I	V	I	Q	V	Y	G	Y	T	E	A
5										6										7									
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
F	D	A	T	I	S	I	K	S	Y	P	D	K	K	F	S	Y	S	S	G	H	V	H	L	S	S	E	N	K	F
8										9										10									
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Q	N	S	A	I	L	T	I	Q	P	K	Q	L	P	G	G	Q	N	P	V	S	Y	V	Y	L	E	V	V	S	K
11					12																								
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4															
H	F	S	K	S	K	R	M	P	I	T	Y	D	N	G															

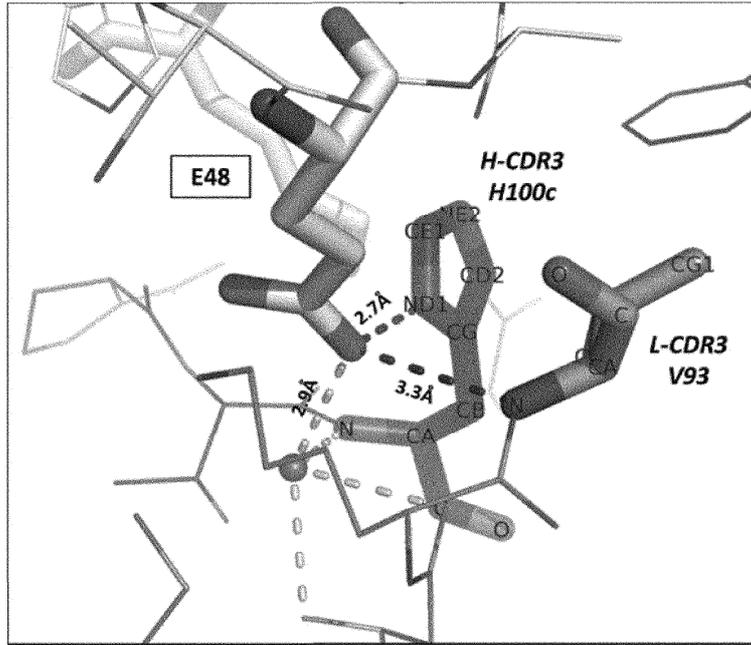
Фиг. 23А



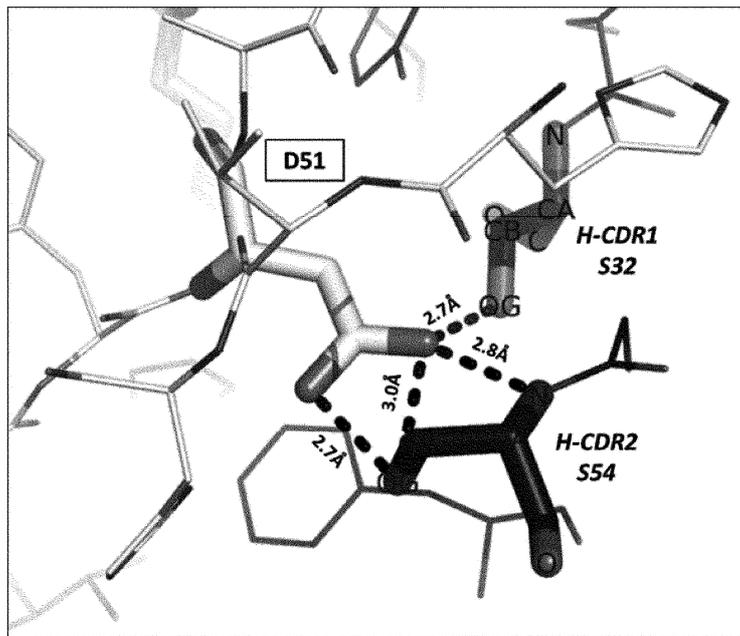
Фиг. 23Б



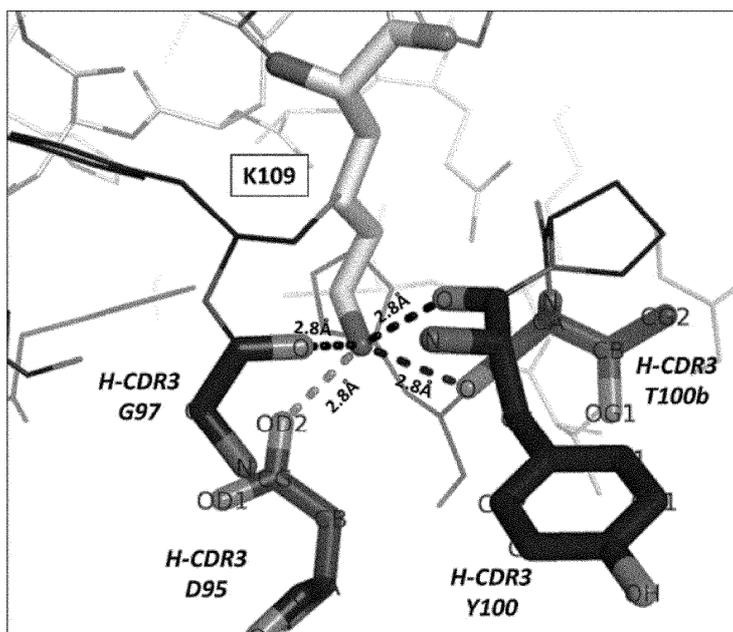
Фиг. 24А



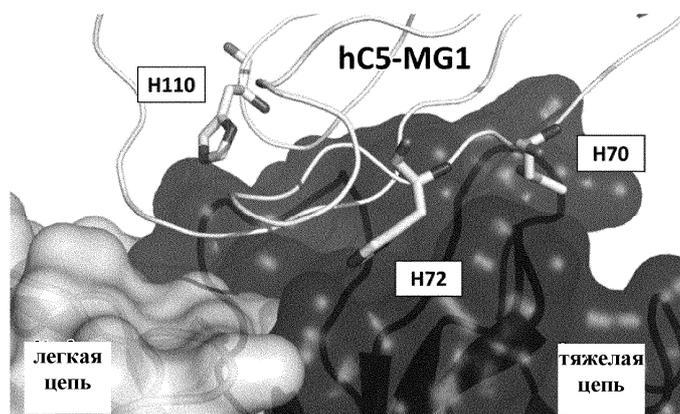
Фиг. 24Б



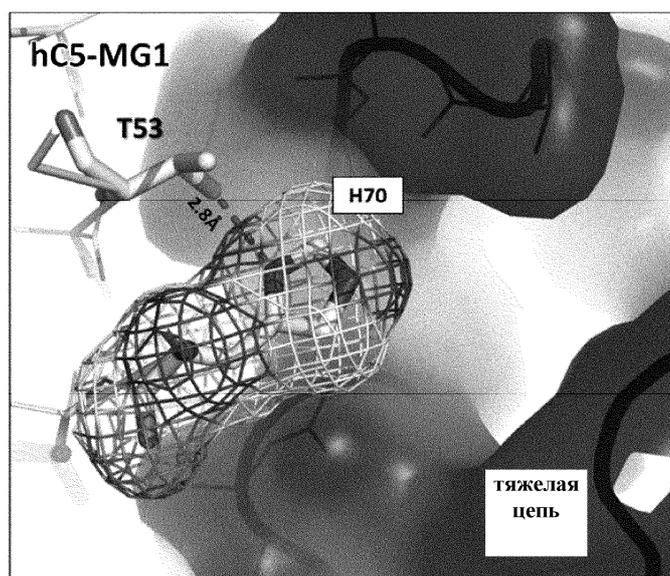
Фиг. 24В



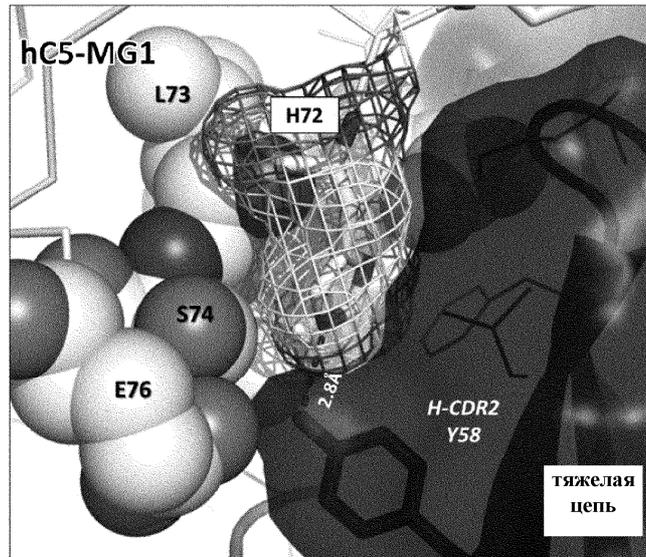
Фиг. 24Г



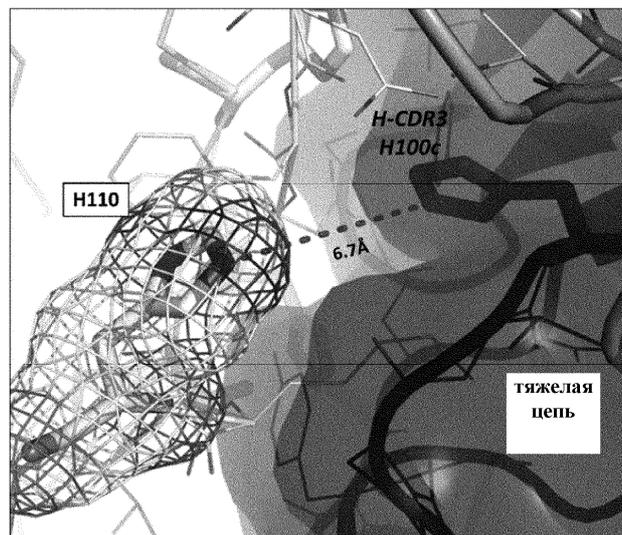
Фиг. 25А



Фиг. 25Б



Фиг. 25В



Фиг. 25Г