

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041723**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | | |
|---------------------------------------|---------------|------------------------------|
| (45) Дата публикации и выдачи патента | (51) Int. Cl. | <i>A61K 39/395</i> (2006.01) |
| 2022.11.28 | | <i>C07K 16/00</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки | | <i>C07K 16/18</i> (2006.01) |
| 201992091 | | <i>C07K 16/28</i> (2006.01) |
| (22) Дата подачи заявки | | <i>C07K 16/46</i> (2006.01) |
| 2018.03.06 | | <i>C12N 15/09</i> (2006.01) |

(54) **АНТИ-C5 АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

- | | |
|---|------------------------|
| (31) 62/467,498 | (56) US-A1-20160176954 |
| (32) 2017.03.06 | US-A1-20150239966 |
| (33) US | US-A1-20160355580 |
| (43) 2020.02.29 | US-A1-20160251433 |
| (86) PCT/US2018/021001 | US-A1-20160229908 |
| (87) WO 2018/165062 2018.09.13 | US-A1-20160200805 |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец: | US-A1-20160068592 |
| ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ | |
| ЮНИВЕРСИТИ ОФ | |
| ПЕНСИЛЬВАНИЯ (US) | |
| (72) Изобретатель: | |
| Сун Вэньчао, Сато Саяка, Мива | |
| Такаси, Джуллипалли Дамодар (US) | |
| (74) Представитель: | |
| Медведев В.Н. (RU) | |

-
- (57) Изобретение относится к ингибированию передачи сигнала комплемента с использованием анти-C5 антитела. В частности, настоящее изобретение относится к способам лечения комплемент-опосредуемого заболевания или комплемент-опосредуемого расстройства у индивидуума посредством приведения в контакт индивидуума с анти-C5 антителом.

B1

041723

041723

B1

Перекрестная ссылка на родственную заявку

В настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США No. 62/467498, поданной 6 марта 2017, и содержание этой заявки включено в настоящее изобретение в полном объеме.

Заявление об исследованиях или разработках, проводимых на средства Федерального правительства, выступаемого в качестве спонсора

Изобретение было разработано при поддержке Правительства на грант NIH AI44970, выданный Национальным Институтом Здравоохранения (NIH). Правительство имеет определенные права на это изобретение.

Предпосылки создания изобретения

Система комплемента представляет собой часть природной иммунной системы, которая играет ключевую роль в защите хозяина. Однако, было обнаружено, что активированный комплемент может также вызывать серьезные повреждения и деструкцию ткани, и что нарушение регуляции активности комплемента ассоциируется с развитием ряда редких и широко распространенных заболеваний, таких как пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), атипичский гемолитический уремический синдром, ревматоидный артрит, возрастная дегенерация желтого пятна и т.п. Таким образом, терапия антителами против комплемента является перспективным способом лечения этих заболеваний у человека.

Комплемент C5 представляет собой белок, играющий ключевую роль в терминальном пути активации комплемента и представляет собой белок-предшественник, продуцирующий сильный провоспалительный медиатор C5a, а также цитолитический мембрано-атакующий комплекс (MAC).

Ряд воспалительных и аутоиммунных заболеваний у человека опосредуется C5a и/или MAC, а блокирование активации C5 должно предупреждать образование C5a и MAC, а поэтому имеет терапевтическую ценность. Гуманизованное мышиное mAb против C5 человека, экулизумаб, было использовано для лечения двух комплемент-опосредуемых заболеваний, таких как пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH) и атипичский гемолитический уремический синдром (aHUS). Однако, не все пациенты с PNH являются восприимчивыми к лечению экулизумабом, и одной из причин такого отсутствия восприимчивости является генетический полиморфизм C5 человека, ассоциированный с потерей эпитопа, связывающегося с экулизумабом.

Таким образом, необходимо получить mAb против C5 человека, которые могли бы ингибировать терминальную активность комплемента посредством различных механизмов и сайтов приведения в контакт на C5, что позволило бы проводить более эффективное лечение патологий, зависящих от комплемента. Настоящее изобретение направлено на решение и удовлетворение этих и других потребностей.

Сущность изобретения

В одном из своих вариантов, настоящее изобретение включает антитело, которое специфически связывается с C5. В одном из вариантов осуществления изобретения, C5 представляет собой человеческий C5. В одном из вариантов осуществления изобретения, антителом является моноклональное антитело. В одном из вариантов осуществления изобретения, антителом является гуманизованное антитело. В одном из вариантов осуществления изобретения, антителом является химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антителом является полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело представляет собой фрагмент антитела, которым является, но не ограничивается ими, Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂ и scFv. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело представляет собой часть конструкции, например, гибридной конструкции, содержащей антитело и нацеливающую молекулу или эффекторную молекулу. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело представляет собой часть конструкции-конъюгата, такой как конструкция конъюгата "антитело-лекарственное средство".

В одном из вариантов осуществления изобретения, антитело включает по меньшей мере одну из CDR, выбранных из группы, состоящей из VH-CDR1: SEQ ID NO:3; VH-CDR2: SEQ ID NO:4; VH-CDR3: SEQ ID NO:5; VL-CDR1: SEQ ID NO:8; VL-CDR2: SEQ ID NO:9; и VL-CDR3: SEQ ID NO:10 или их варианта или вариантов. В одном из вариантов осуществления изобретения, антитело включает CDR: VH-CDR1: SEQ ID NO:3; VH-CDR2: SEQ ID NO:4; VH-CDR3: SEQ ID NO:5; VL-CDR1: SEQ ID NO:8; VL-CDR2: SEQ ID NO:9; и VL-CDR3: SEQ ID NO:10 или их вариант или варианты.

В одном из вариантов осуществления изобретения, антитело включает тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или ее вариант. В одном из вариантов осуществления изобретения, антитело включает легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 или ее вариант. В одном из вариантов осуществления изобретения, антитело включает тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, или их вариант или варианты.

В одном из вариантов осуществления изобретения, антитело включает по меньшей мере одну из CDR, выбранных из группы, состоящей из VH-CDR1: SEQ ID NO:13; VH-CDR2: SEQ ID NO:14; VH-CDR3: SEQ ID NO:15; VL-CDR1: SEQ ID NO:18; VL-CDR2: SEQ ID NO:19; и VL-CDR3: SEQ ID NO:20 или их варианта или вариантов. В одном из вариантов осуществления изобретения, антитело включает CDR: VH-CDR1: SEQ ID NO:13; VH-CDR2: SEQ ID NO:14; VH-CDR3: SEQ ID NO:15; VL-CDR1: SEQ ID

фузионного повреждения, артрита, ревматоидного артрита, астмы, аллергической астмы, волчанки, язвенного колита, инсульта, постхирургического системного воспалительного синдрома, астмы, аллергической астмы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), синдрома пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), тяжелой миастении, нейромиелимита зрительного нерва (NMO), рассеянного склероза, замедления функции трансплантата, отторжения, опосредуемого антителом, атипического гемолитического уремического синдрома (aHUS), окклюзии центральной вены сетчатки (CRVO), окклюзии центральной артерии сетчатки (CRAO), буллезного эпидермолиза, сепсиса, трансплантации органов, воспаления (включая, но не ограничиваясь ими, воспаление, ассоциированное с операцией по сердечно-легочному шунтированию и с почечным диализом), С3-гломерулопатии, мембранозной нефропатии, IgA-нефропатии, гломерулонефрита (включая, но не ограничиваясь ими, гломерулонефрит, опосредуемый цитоплазматическим антителом против нейтрофилов (ANCA), волчаночный нефрит и их комбинации), ANCA-опосредованного васкулита, HUS, индуцированного Шига-токсином, и потери плода, индуцированной антифосфолипидным антителом или любых их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения, AP-опосредованным заболеванием является С3-гломерулопатия. В некоторых вариантах осуществления изобретения, AP-опосредованным заболеванием является дегенерация желтого пятна, такая как возрастная дегенерация желтого пятна. В одном из вариантов осуществления изобретения, введение анти-С5 антитела ингибирует продуцирование белка С5а или С5b.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к способу снижения активности системы комплемента у индивидуума, где указанный способ включает введение антитела индивидууму способом, выбранным из группы, состоящей из энтерального введения, парентерального введения и их комбинации, и где антитело содержит шесть гипервариабельных областей, имеющих следующие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:10 или их вариант или варианты. В одном из вариантов осуществления изобретения, антителом является фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, scFv и их комбинаций.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к способу снижения активности системы комплемента у индивидуума, где указанный способ включает введение антитела индивидууму способом, выбранным из группы, состоящей из энтерального введения, парентерального введения и их комбинации, и где антитело содержит шесть гипервариабельных областей, имеющих следующие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 и SEQ ID NO:20 или их вариант или варианты. В одном из вариантов осуществления изобретения, антителом является фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, scFv и их комбинаций.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к способу снижения активности системы комплемента у индивидуума, где указанный способ включает введение антитела индивидууму способом, выбранным из группы, состоящей из энтерального введения, парентерального введения и их комбинации, и где антитело содержит шесть гипервариабельных областей, имеющих следующие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29 или их вариант или варианты. В одном из вариантов осуществления изобретения антителом является фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, scFv и их комбинаций.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к способу снижения активности системы комплемента у индивидуума, где указанный способ включает введение антитела индивидууму способом, выбранным из группы, состоящей из энтерального введения, парентерального введения и их комбинации, и где антитело содержит шесть гипервариабельных областей, имеющих следующие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 и SEQ ID NO:39 или их вариант или варианты. В одном из вариантов осуществления изобретения, антителом является фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, scFv и их комбинаций.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к способу снижения активности системы комплемента у индивидуума, где указанный способ включает введение антитела индивидууму способом, выбранным из группы, состоящей из энтерального введения, парентерального введения и их комбинации, и где антитело содержит шесть гипервариабельных областей, имеющих следующие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48 и SEQ ID NO:49 или их вариант или варианты. В одном из вариантов осуществления изобретения, антителом является фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, scFv и их комбинаций.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к способу снижения активности системы комплемента у индивидуума, где указанный способ включает введение антитела индивидууму способом, выбранным из группы, состоящей из энтерального введения, парентерального введения и их комбинации, и где антитело содержит шесть гипервариабельных областей, имеющих следующие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, и SEQ ID NO:59 или их вариант или варианты. В одном из вариантов осуществления изобрете-

более, чем на 90% (например, более, чем на любые из 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO:56. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, scFv и их комбинаций.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к клетке, содержащей по меньшей мере одно из описанных в настоящем документе антител. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка продуцирует по меньшей мере одно из описанных в настоящем документе антител. В одном из вариантов осуществления изобретения клеткой является гибридома.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к клеточной линии, содержащей по меньшей мере одно из описанных в настоящем документе антител. В некоторых вариантах осуществления изобретения клеточная линия продуцирует по меньшей мере одно из описанных в настоящем документе антител. В некоторых вариантах осуществления изобретения клеточной линией является гибридная клеточная линия.

Краткое описание чертежей

Описанное выше общее, а также нижеследующее подробное описание репрезентативных вариантов изобретения приводится со ссылкой на прилагаемые чертежи для лучшего понимания настоящего изобретения. Однако следует отметить, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными устройствами и оборудованием согласно изобретению, описанными в чертежах.

На фиг. 1 представлены результаты ELISA-анализа, иллюстрирующие связывание mAb против C5 человека 4E7, 9G6, 11C5, 2G1, 11D9 и 8E1 с C5 человека. Описан ELISA-анализ на прямое связывание с антигеном, где mAb были серийно разведены во всех микротитрационных планшетах, покрытых очищенным человеческим C5. Все шесть mAb обнаруживали способность реагировать с C5 человека на высоком уровне.

На фиг. 2-7 представлены результаты экспериментов по оценке аффинностей связывания анти-C5 mAb 2G1, 8E1, 4E7, 9G6, 11C5 и 11D9 с C5. Очищенное α m-mAb против кроличьих IgG (RAMFc) связывали с чипом CM4 методом присоединения амина. Затем, анти-C5 mAb захватывали на иммобилизованном RAMFc. Анализы Biacore проводили на оборудовании Biacore-2000.

На фиг. 8 проиллюстрировано дозозависимое ингибирование LPS-индуцированного продуцирования C5a mAb против C5 человека 4E7, 9G6, 11C5, 2G1, 11D9 и 8E1. Для оценки влияния mAb против C5 человека на LPS-индуцированное продуцирование C5a была использована комбинация из двух анализов: анализа на LPS-индуцированное продуцирование C5a и "сэндвич"-ELISA на человеческий C5a. Все шесть mAb эффективно ингибировали LPS-индуцированное продуцирование C5a при добавлении к 10% нормальной человеческой сыворотке (NHS) в конечной концентрации 12,5 мкг/мл.

На фиг. 9, включающей фиг. 9A и фиг. 9B, проиллюстрировано влияние mAb против C5 человека 4E7, 9G6, 11C5, 2G1, 11D9 и 8E1 на гемолиз, опосредуемый комплементом. На фиг. 9A проиллюстрирован лизис эритроцитов (RBC), определенный путем измерения оптической плотности OD₄₀₅ после инкубирования овечьих RBC, сенсibilизированных антителом, с 50% NHS, содержащей серийные разведения каждого анти-C5 mAb при 37°C в течение 1 ч. Лизис RBC определяли путем измерения оптической плотности на 405 нм. При 120 мкг/мл, все mAb ингибировали лизис овечьих эритроцитов, опосредуемый 50% NHS. При более низких дозах (например, 30-60 мкг/мл), 9G6 было менее активным в предупреждении гемолиза, чем другие mAb. На фиг. 9B проиллюстрировано, что при 30 мкг/мл, mAb 2G1 и 8E1 более активно ингибировали опосредуемый комплементом гемолиз, чем 4E7, 9G6, 11C5 и 11D9.

На фиг. 10 представлены результаты экспериментов по оценке влияния mAb против C5 человека 4E7, 9G6, 11C5, 2G1, 11D9, 8E1 на опосредуемый комплементом гемолиз при использовании сыворотки, взятой у животных различных видов. Куриные RBC, сенсibilизированные антителом, инкубировали с 50% NHS, с нормальной кроличьей сывороткой, сывороткой макака-резуса или с сывороткой собакоподобных обезьян, каждая из которых содержит анти-C5 mAb (конечная концентрация: 50 мкг/мл) при 37°C в течение 1 ч. Лизис RBC определяли путем измерения оптической плотности на 405 нм, и нормализовали на сыворотку плюс EDTA в качестве негативного контроля (0%), и на сыворотку, не содержащую антитела, в качестве позитивного контроля (100%). В анализе на гемолиз с использованием NHS, пять из шести mAb против C5 человека в значительной степени ингибировали гемолиз, то есть, более, чем на 50%. В частности, пробы NHS, содержащие 2G1, указывали на почти полное ингибирование гемолиза. При обработке mAb 9G6 или 2G1, гемолитическая активность в кроличьей сыворотке значительно снижалась. С другой стороны, ни одно из mAb существенно не ингибировало комплемент-опосредуемый гемолиз при использовании обезьяньей сыворотки (макак-резуса и собакоподобных обезьян).

На фиг. 11 представлены результаты экспериментов по оценке влияния mAb против C5 человека 2G1 и 8E1 на опосредуемый комплементом гемолиз. Куриные RBC, сенсibilизированные антителом, инкубировали с 50% NHS, содержащей серийные разведения 2G1 или 8E1 или контрольного mAb (MORC, мышинового IgG1) при 37°C в течение 1 ч. Лизис RBC определяли путем оценки оптической плотности OD_{405нм}. В этом анализе, mAb 2G1 и 8E1 имели аналогичные активности.

На фиг. 12 представлены результаты экспериментов по оценке влияния mAb против C5 человека 2G1 на гемолиз RBC при PNH. RBC, взятые у пациентов с пароксизмальной ночной гемоглобинурией (PNH), подвергали тестированию с использованием подкисленной сыворотки Хэмса в присутствии или в отсутствие mAb 2G1. RBC инкубировали с 50% NHS, содержащей серийные разведения 2G1, при 37°C в течение 1 часа. Лизис RBC определяли путем оценки оптической плотности OD_{405nm} . В отсутствие mAb, приблизительно 35% RBC подвергались лизису под действием подкисленной сыворотки, а обработка mAb 2G1 приводила к 70% снижению гемолитической активности при 25 мкг/мл и к 85% снижению при 40 мкг/мл.

На фиг. 13 представлены последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей mAb 2G1.

На фиг. 14 представлены последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей mAb 8E1.

На фиг. 15 представлены последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей mAb 4E7.

На фиг. 16 представлены последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей mAb 9G6.

На фиг. 17 представлены последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей mAb 11C5.

На фиг. 18 представлены последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей mAb 11D9.

На фиг. 19 представлены аминокислотные последовательности константной области тяжелой цепи IgG4 человека с заменой серина 228 на пролин (то есть, S228P) и константной области человеческой легкой цепи каппа. Эти последовательности были использованы для конструирования химерного (мышинная варибельная область+человеческие константные области) и гуманизированного (гуманизированная мышинная варибельная область+человеческие константные области) антитела против C5 человека (2G1).

На фиг. 20 представлены результаты экспериментов по оценке реакции взаимодействия химерного mAb 2G1 против человеческого IgG4 с C5 человека. Химерное 2G1 было получено путем присоединения варибельных областей mAb 2G1 к константной области тяжелой цепи человеческого IgG4, несущей мутацию S228P, и к константной области человеческой легкой цепи каппа. Планшет покрывали человеческим C5. После инкубирования с серийно разведенным химерным mAb 2G1, связанное химерное mAb детектировали с использованием ПХ-конъюгированного антитела против человеческого IgG4. Химерное 2G1 связывалось с C5 человека в зависимости от дозы.

На фиг. 21 представлены результаты экспериментов по оценке влияния химерного mAb "2G1-человеческий IgG4" на гемолиз, опосредуемый классическими путями комплемента. Сенсibilизированные овечьи RBC инкубировали с 50% NHS, содержащей серийно разведенное химерное 2G1 при 37°C в течение 1 ч. Лизис RBC определяли путем оценки оптической плотности OD_{405nm} . Результат показал, что при 30 мкг/мл и при более высоких концентрациях, химерное mAb 2G1 эффективно ингибировало NHS-опосредуемый лизис овечьих эритроцитов.

На фиг. 22 представлены нуклеотидные и аминокислотные последовательности гуманизированной варибельной тяжелой цепи (VH) mAb 2G1 (гуманизированного 2G1 VH-11801). Гуманизация была достигнута путем присоединения CDR VH мышинного mAb 2G1 к кодируемой человеческой VH зародышевой линии с сохранением рамки считывания (11801). Аминокислотная последовательность сигнального пептида подчеркнута, а последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 выделена жирным шрифтом и заштрихована.

На фиг. 23 представлены нуклеотидные и аминокислотные последовательности другой гуманизированной VH mAb 2G1 (гуманизированного 2G1 VH-16901). Гуманизация была достигнута путем присоединения CDR VH мышинного mAb 2G1 к кодируемой человеческой VH зародышевой линии с сохранением рамки считывания (16901). Аминокислотная последовательность сигнального пептида подчеркнута, а последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 выделена жирным шрифтом и заштрихована.

На фиг. 24 представлены нуклеотидные и аминокислотные последовательности гуманизированной варибельной легкой цепи (VL) mAb 2G1 (гуманизированного 2G1 VL-1901). Гуманизация была достигнута путем присоединения CDR VL мышинного mAb 2G1 к кодируемой человеческой VL зародышевой линии с сохранением рамки считывания (1901). Аминокислотная последовательность сигнального пептида подчеркнута, а последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 выделена жирным шрифтом и заштрихована.

На фиг. 25 представлены результаты экспериментов по оценке реакции взаимодействия гуманизированного 2G1 (VH-11801/VL-1901) с C5 человека. Гуманизированное 2G1 (VH-11801/VL-1901) экспрессировалось как mAb против человеческого IgG4 с мутацией S228P в Fc-домене. Планшет покрывали человеческим C5. После инкубирования с серийно разведенным гуманизированным 2G1 (VH-11801/VL-1901), связанное mAb детектировали с использованием ПХ-конъюгированного антитела против человеческого IgG4. Гуманизированное 2G1 (VH-11801/VL-1901) связывалось с C5 человека в зависимости от

дозы.

На фиг. 26 представлены результаты экспериментов по оценке реакции взаимодействия гуманизированного 2G1 (VH-16901/VL-1901) с C5 человека. Гуманизированное 2G1 (VH-16901/VL-1901) экспрессировалось как mAb против человеческого IgG4 с мутацией S228P в Fc-домене. Планшет покрывали человеческим C5. После инкубирования с серийно разведенным гуманизированным 2G1 (VH-16901/VL-1901), связанное mAb детектировали с использованием ПХ-конъюгированного антитела против человеческого IgG4. Гуманизированное 2G1 (VH-16901/VL-1901) связывалось с C5 человека в зависимости от дозы.

На фиг. 27 представлены результаты экспериментов по оценке влияния гуманизированного 2G1 (VH-11801/VL-1901) на гемолиз, опосредуемый классическими путями комплемента. Гуманизированное 2G1 (VH-11801/VL-1901) экспрессировалось как mAb против человеческого IgG4 с мутацией S228P в Fc-домене. Овечьи RBC, сенсibilизированные антителом, инкубировали с 10% NHS, содержащей серийно разведенное гуманизированное 2G1 (VH-11801/VL-1901) при 37°C в течение 1 часа. Лизис RBC определяли путем оценки оптической плотности OD_{405nm}. Гуманизированное 2G1 (VH-11801/VL-1901) значительно ингибировало лизис овечьих эритроцитов, опосредуемый 10% NHS при концентрациях mAb 10 мкг/мл и при более высоких концентрациях mAb.

На фиг. 28 представлены результаты экспериментов по оценке влияния гуманизированного 2G1 (VH-16901/VL-1901) на гемолиз, опосредуемый классическими путями комплемента. Гуманизированное 2G1 (VH-16901/VL-1901) экспрессировалось как mAb против человеческого IgG4 с мутацией S228P в Fc-домене. Овечьи RBC, сенсibilизированные антителом, инкубировали с 10% NHS, содержащей серийно разведенное гуманизированное 2G1 (VH-16901/VL-1901) при 37°C в течение 1 ч. Лизис RBC определяли путем оценки оптической плотности OD_{405nm}. Гуманизированное 2G1 (VH-16901/VL-1901) значительно ингибировало лизис овечьих эритроцитов, опосредуемый 10% NHS, при концентрациях mAb 10 мкг/мл и при более высоких концентрациях.

На фиг. 29, включающей фиг. 29А и 29В, представлены результаты экспериментов, проводимых с помощью Вестерн-блоттинга для детектирования C5 человека с использованием mAb 2G1-3 (фиг. 29А) и контрольного mAb QDC5 (фиг. 29В), и эти результаты показали, что mAb 2G1-3 связывается с β-цепью C5 человека. Человеческий C5 (был использован 1 мкг на дорожку, от Comptech, cat#A120) подвергали электрофорезу в ДСН-ПААГ в невосстанавливающих (NR) или в восстанавливающих (R) условиях. Контрольное mAb QDC5 представляет собой рекомбинантное mAb против человеческого IgG4, несущее последовательности VH и VL гуманизированного мышиного mAb против C5 человека, как описано Thomas et al. (Mol. Immunol. 1996 Dec;33(17-18):1389-401). Известно, что это mAb связывается с эпитопом в α-цепи C5 человека. Как и ожидалось, оба mAb 2G1-3 и QDC5 связываются с невосстановленным человеческим C5 аналогичным образом. В восстанавливающих условиях, как и ожидалось, QDC5 связывается с α-цепью C5 человека, тогда как mAb 2G1-3 связывается с другой полосой, соответствующей β-цепи C5 человека. После электрофореза в ДСН-ПААГ, белки переносили на PVDF-мембрану и блокировали 5% обезжиренным сухим молоком в TBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Мембраны инкубировали с 10 мкг/мл 2G1-3 или QDC5 в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки TBS с 0,1% Твином-20 (TBST) в течение 6×5 мин, к мембранам добавляли кроличье ПХ-конъюгированное антитело против α-цепи мышиного IgG или ПХ-конъюгированное антитело против α-цепи человеческого IgG при разведении 1:4000 и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После последней промывки, белки детектировали с использованием субстрата для вестерн-блот-анализа Pierce™ ECL 2 в соответствии с инструкциями производителей.

На фиг. 30, включающей фигуры 30А и 30В, представлены структура домена и последовательности C5 человека. Человеческий C5 состоит из α- и β-цепей, разделенных небольшим сегментом C5a, который высвобождается после активации C5 (фиг. 30А). В свою очередь β-цепь C5 человека состоит из 6 доменов MG с перечисленными аминокислотными последовательностями (фиг. 30В).

На фиг. 31, включающей фигуры 31А и 31В, представлены результаты детектирования с помощью Вестерн-блот-анализа β-цепи человеческого C5 и мутантов с делецией β-цепи C5 человека, не содержащих отдельных доменов MG (Фиг. 31А). Вестерн-блот-анализ, проводимый с использованием козьего поликлонального антитела против C5 человека, выявил присутствие интактной β-цепи и мутантов с делецией 6 доменов MG, транзитно экспрессируемых в клетках НЕК. Супернатанты трансфицированных клеток НЕК использовали для анализа. Числа 1, 2, 3, 4, 5, 6 соответствуют мутантам с делециями MG1, MG2, MG3, MG4, MG5 и MG6. Супернатант нетрансфицированных клеток НЕК (контрольных) использовали в качестве негативного контроля. Полученные результаты указывали на экспрессию всех мутантов с делециями (фиг. 31В). Вычисленные молекулярные массы в кДа для β-цепи C5 человека и мутантов с 6 делециями MG соответствовали детектированным полосам в Вестерн-блот-анализе.

На фиг. 32 представлены результаты "сэндвич"-ELISA-анализа для оценки ключевых доменов MG с β-цепью C5 человека на связывание с mAb 2G1-3. mAb 2G1-3 наносили на 96-луночный планшет и добавляли супернатанты нетрансфицированных или трансфицированных клеток НЕК. После инкубирования и промывки, связанную β-цепь или мутантные белки с делециями детектировали с использованием

"второго" mAb SKY59 против человеческого C5 (Fukuzawa et al., Sci Rep. 2017 Apr 24; 7 (1): 1080. doi: 10.1038/s41598-017-01087-7), которое, как известно, связывается с последовательностями в домене MG1 C5 человека. Полученные данные продемонстрировали, что сигналы для мутантов с делециями MG2, MG3, MG5 и MG6 еще детектировались, что позволяет предположить, что эти домены не участвуют в связывании с 2G1-3 или SKY59. С другой стороны, мутанты с делециями MG1 и MG4 теряли свою способность к связыванию, что позволяет предположить, что они играют важную роль в связывании C5 человека под действием 2G1-3 или SKY59 или того и другого.

Нормальную человеческую сыворотку (NHS) и супернатант клеток, трансфицированных интактной β -цепью, использовали в качестве позитивного контроля, а супернатант нетрансфицированных клеток НЕК (контрольных) использовали в качестве негативного контроля.

На фиг. 33 представлены результаты "сэндвич"-ELISA-анализа с использованием поликлонального анти-C5 антитела для детектирования, и эти результаты показали, что домен MG4 в β -цепи C5 человека играет ключевую роль в связывании mAb 2G1-3. 2G1-3 наносили на 96-луночный планшет и добавляли супернатанты нетрансфицированных или трансфицированных клеток НЕК. После инкубирования и промывки, связанную β -цепь или мутантные белки с делециями в супернатантах после трансфекции детектировали с использованием козьего поликлонального антитела против человеческого C5. Сигналы детектировались в нормальной человеческой сыворотке (NHS) и в супернатантах интактной человеческой β -цепи и в мутантах с делецией MG1, но не в мутантах с делецией MG4, что позволяет предположить, что в связывании 2G1-3 ключевую роль играет MG4, но не MG1 в β -цепи.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к ингибированию передаче сигнала комплемента с использованием анти-C5 антитела. В своих различных вариантах настоящее изобретение относится к композициям и способам для лечения комплемент-опосредуемого заболевания или комплемент-опосредуемого расстройства у индивидуума посредством приведения в контакт индивидуума с анти-C5 антителом. Комплемент-опосредуемыми патологиями и состояниями, которые могут быть подвергнуты лечению с применением композиций и способов согласно изобретению, являются, но не ограничиваются ими, дегенерация желтого пятна (MD), возрастная дегенерация желтого пятна (AMD), ишемическое реперфузионное повреждение, артрит, ревматоидный артрит, волчанка, язвенный колит, инсульт, постхирургический системный воспалительный синдром, астма, аллергическая астма, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), синдром пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), тяжелая миастения, нейромиелиит зрительного нерва (NMO), рассеянный склероз, замедление функции трансплантата, отторжение, опосредуемое антителом, атипичский гемолитический уремический синдром (aHUS), окклюзия центральной вены сетчатки (CRVO), окклюзия центральной артерии сетчатки (CRAO), буллезный эпидермолиз, сепсис, трансплантация органов, воспаление (включая, но не ограничиваясь ими, воспаление, ассоциированное с операцией по сердечно-легочному шунтированию и с почечным диализом), С3-гломерулопатия, мембранозная нефропатия, IgA-нефропатия, гломерулонефрит (включая, но не ограничиваясь ими, гломерулонефрит, опосредуемый цитоплазматическим антителом против нейтрофилов (ANCA), волчаночный нефрит и их комбинации), ANCA-опосредованный васкулит, HUS, индуцированный Шига-токсином, и потеря плода, индуцированная антифосфолипидным антителом или любые их комбинации.

Определения

Если это не оговорено особо, то все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя для практического применения изобретения или проведения тестов могут быть использованы любые методы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе методам или материалам, однако, в настоящем изобретении описаны репрезентативные методы и материалы.

Каждый из используемых в настоящем документе терминов имеет значение, соответствующее этому разделу.

Используемые в настоящем документе термины "ингибировать" и "ингибирование" означают снижение, подавление, ослабление или блокирование активности или функции по меньшей мере приблизительно на 10% по сравнению с контрольной величиной. В некоторых вариантах осуществления изобретения, активность подавляется или блокируется по меньшей мере приблизительно на 50% по сравнению с контрольной величиной. В некоторых вариантах осуществления изобретения активность подавляется или блокируется по меньшей мере приблизительно на 75%. В некоторых вариантах осуществления изобретения активность подавляется или блокируется по меньшей мере приблизительно на 95%.

Термины "эффективное количество" и "фармацевтически эффективное количество" означают количество агента, достаточное для достижения желаемого биологического результата. Таким результатом может быть снижение и/или ослабление признаков, симптомов или факторов, вызывающих заболевание или расстройство, или любое другое желаемое изменение биологической системы. Соответствующее эффективное количество в любом конкретном случае может быть определено специалистом в данной области посредством рутинного экспериментирования.

Используемые в настоящем документе термины "пациент", "субъект", "индивидуум" и т.п. являются синонимами и относятся к любому животному, а в некоторых вариантах осуществления изобретения, к млекопитающему и человеку, имеющему систему комплемента, включая человека, нуждающегося в лечении состояния или его последствий или восприимчивого к лечению такого состояния или его последствий. Индивидуумами могут быть, например, собаки, кошки, свиньи, коровы, овцы, козы, лошади, крысы, обезьяны, мыши и люди.

Используемый в настоящем документе термин "аномальный", если он употребляется по отношению к организмам, тканям, клеткам или их компонентам, относится к организмам, тканям, клеткам или их компонентам, которые отличаются по меньшей мере одним наблюдаемым или детектируемым признаком (например, возрастом, лечением, временем в днях и т.п.) от организмов, тканей, клеток или их компонентов, которые имеют "нормальный" (ожидаемый/гомеостатический) соответствующий признак. Признаки, которые являются нормальными или ожидаемыми для клеток, тканей или индивидуумов одного типа, могут быть аномальными для клеток или тканей других типов.

"Заболевание" представляет собой состояние здоровья индивидуума, при котором у индивидуума не может поддерживаться гомеостаз, и если это заболевание не ослабляется, то состояние здоровья индивидуума продолжает ухудшаться.

В противоположность этому, "расстройством" у индивидуума является состояние здоровья индивидуума, при котором у индивидуума поддерживается гомеостаз, но, при этом, состояние здоровья индивидуума несколько ухудшается по сравнению с состоянием индивидуума в отсутствие такого расстройства. Невылеченное расстройство необязательно приводит к последующему ухудшению состояния здоровья индивидуума.

Заболевание или расстройство считается "ослабленным", если снижается тяжесть их признаков или симптомов, а также частота появления у пациента такого признака или симптома, или то и другое.

"Эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" соединения означает количество соединения, достаточное для достижения желаемого эффекта у индивидуума, которому вводят это соединение.

Используемый в настоящем документе термин "пояснительный материал" включает публикацию, запись, диаграмму или любую другую информацию, которая может быть использована в наборе как руководство по применению соединения, композиции, вектора или системы доставки согласно изобретению для эффективного ослабления различных описанных в настоящем документе заболеваний или расстройств. Необязательно или альтернативно, в пояснительном материале могут быть описаны один или более способов ослабления заболеваний или расстройств в клетках или тканях млекопитающего. Пояснительный материал набора согласно изобретению может быть, например, наклеен на контейнер, содержащий идентифицированное соединение, композицию, вектор или систему доставки согласно изобретению, либо он может быть вложен в контейнер, содержащий идентифицированное соединение, композицию, вектор или систему доставки. Альтернативно, пояснительный материал может поставляться отдельно от контейнера, причем, предусматривается, что пояснительный материал поставляется реципиенту вместе с соединением.

Используемый в настоящем документе термин "функционально связанный" или "функционально присоединенный" может означать, что экспрессия гена находится под контролем промотора, к которому он пространственно присоединен. Промотор может быть расположен со стороны 5'-конца (выше) или 3'-конца (ниже) от гена, который находится под его контролем. Расстояние между промотором и геном может быть приблизительно равно расстоянию между промотором и геном, находящимся под контролем промотора, который происходит от этого гена. Как известно специалистам, изменение такого расстояния может быть достигнуто без потери функции промотора.

"Терапевтическое лечение" означает лечение индивидуума, у которого наблюдаются признаки заболевания или расстройства, в целях снижения или устранения этих признаков.

Используемое в настоящем документе выражение "лечение заболевания или расстройства" означает снижение частоты и/или тяжести признака и/или симптома заболевания или расстройства у пациента.

Используемый в настоящем документе термин "биологический образец", "образец" или "проба" включает любой образец, содержащий клетку, ткань или физиологическую жидкость, в которых может детектироваться экспрессия нуклеиновой кислоты или полипептида. Биологический образец может содержать любой биологический материал, подходящий для детектирования нужных биомаркеров, и может содержать клеточный и/или неклеточный материал, взятый у индивидуума. Примерами таких биологических образцов являются, но не ограничиваются ими, кровь, лимфа, костный мозг, биоптаты и мазки. Образцы, которые являются жидкими по своей природе, называются в настоящем документе "физиологическими жидкостями". Биологические образцы могут быть взяты у пациента различными методами, включая, например, соскабливание или тампонирование определенной площади или использование иглы для получения физиологических жидкостей. Методы взятия различных образцов из организма хорошо известны специалистам.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" означает молекулу иммуноглобулина, способную специфически связываться со специфическим эпитопом антигена. Антитела могут представ-

лять собой интактные иммуноглобулины, происходящие от природных источников или от рекомбинантных источников, и могут представлять собой иммунореактивные части интактных иммуноглобулинов. Антитела согласно изобретению могут присутствовать в различных формах, включая, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, внутриклеточные антитела ("интраантитела"), Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂, а также одноцепочечные антитела (scFv), антитела с тяжелой цепью, такие как верблюжьих антитела, и гуманизированные антитела (Harlow et al., 1999, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Bird et al., 1988, *Science* 242:423-426).

Используемый в настоящем документе термин "синтетическое антитело" означает антитело, которое было получено методами рекомбинантных ДНК, например, антитело, экспрессируемое бактериофагом. Этот термин должен также означать антитело, которое было получено путем синтеза молекулы ДНК, кодирующей антитело и экспрессирующей антитело-белок или аминокислотную последовательность, определяющую это антитело, где ДНК или аминокислотная последовательность были получены с применением технологии синтеза ДНК или аминокислотных последовательностей, которые являются доступными и хорошо известны специалистам.

Используемый в настоящем документе термин "антитело с тяжелой цепью" или "антитела с тяжелой цепью" включает молекулы иммуноглобулина, происходящие от животных семейства верблюжьих и полученные либо путем иммунизации пептидом с последующим выделением сыворотки, либо путем клонирования и экспрессии последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих такие антитела. Термин "антитело с тяжелой цепью" или "антитела с тяжелой цепью" также охватывает молекулы иммуноглобулина, выделенные у индивидуума с "болезнью тяжелых цепей" или полученные путем клонирования и экспрессии генов VH (вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина) индивидуума.

"Химерное антитело" означает сконструированное антитело определенного типа, которое содержит природную вариабельную область (легкой цепи и тяжелых цепей), происходящую от донорного антитела, в комбинации с константными областями легкой и тяжелой цепей, происходящими от акцепторного антитела.

"Гуманизированное антитело" означает сконструированное антитело определенного типа, имеющее CDR, происходящее от нечеловеческого донорного иммуноглобулина, при этом, остальные части, происходящие от молекулы иммуноглобулина, происходят от одного или более человеческих иммуноглобулинов. Кроме того, остатки каркасного носителя могут быть модифицированы так, чтобы они сохраняли аффинность связывания (см., например, 1989, Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:10029-10032; 1991, Hodgson et al., *Bio/Technology*, 9:421). Подходящее человеческое акцепторное антитело может быть взято из общедоступной базы данных, например, из базы данных KABAT, базы данных Los Alamos и базы данных белков Swiss Protein, в соответствии с гомологией нуклеотидных и аминокислотных последовательностей донорного антитела. Человеческое антитело, охарактеризованное по гомологии с каркасными областями донорного антитела (на основе аминокислот), может быть подходящим для получения константной области тяжелой цепи и/или вариабельной каркасной области тяжелой цепи для встраивания донорных CDR. Подходящее акцепторное антитело, способное отдавать константные области легкой цепи или вариабельные каркасные области легкой цепи, может быть отобрано аналогичным образом. Следует отметить, что тяжелые и легкие цепи акцепторного антитела необязательно должны происходить от одного и того же акцепторного антитела. В литературе описано несколько способов продуцирования таких гуманизированных антител (см., например, EP-A-0239400 и EP-A-054951).

Термин "донорное антитело" означает антитело (моноклональное и/или рекомбинантное антитело), которое вводит аминокислотные последовательности его вариабельных областей, CDR или других функциональных фрагментов или аналогов первому иммуноглобулину-партнеру с последующей модификацией кодирующей области иммуноглобулина и экспрессией модифицированного антитела с антигенной специфичностью и нейтрализующей активностью, характерной для донорного антитела.

Термин "акцепторное антитело" означает антитело (моноклональное и/или рекомбинантное антитело), которое является гетерологичным донорному антителу, которое вводит все (или любую часть, но не все, в некоторых вариантах) аминокислотные последовательности, содержащие каркасные области тяжелой и/или легкой цепей и/или константные области тяжелой и/или легкой цепей, первому иммуноглобулину-партнеру. В некоторых вариантах осуществления изобретения, человеческим антителом является акцепторное антитело.

"CDR" определены как аминокислотные последовательности гипервариабельной области антитела, которые представляют собой гипервариабельные области тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. См., например, Rabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987). В вариабельной области иммуноглобулина присутствуют три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи (или области CDR). Таким образом, используемый в настоящем документе термин "CDR" означает все три CDR тяжелой цепи или все три CDR легкой цепи (или все CDR тяжелой цепи и все CDR легкой цепи, если они присутствуют). Структура и укладка белка антитела может означать, что другие остатки рассматриваются как часть антигенсвязыва-

вающей области и известны специалистам. См., например, Chothia et al., (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions; Nature 342, p 877-883.

Используемый в настоящем документе термин "иммуноанализ" означает любой анализ на связывание, в котором используется антитело, способное специфически связываться с молекулой-мишенью, для детектирования и количественной оценки молекулы-мишени.

Используемый в настоящем документе термин "специфически связывается", если он употребляется по отношению к антителу, относится к антителу, которое распознает специфическую молекулу-мишень или связывается с ней, но, по существу, не распознает другие молекулы или не связывается с ними в образце. В некоторых случаях, используемые в настоящем документе термины "специфическое связывание" или "специфически связывается", означают, что распознавание и связывание зависит от присутствия конкретной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа) на молекуле-мишени. Если, например, антитело специфически связывается с эпитопом "А", то присутствие немеченной молекулы, содержащей эпитоп А (или свободной, то есть, немеченной А) в реакционной смеси, содержащей меченную "А" и антитело, будет снижать количество меченного А, связанного с антителом.

"Кодирующая область" гена состоит из нуклеотидных остатков кодирующей цепи гена и нуклеотидов не кодирующей цепи гена, которые гомологичны или комплементарны, соответственно, кодирующей области молекулы мРНК, которая продуцируется посредством транскрипции гена.

"Кодирующая область" молекулы мРНК также состоит из нуклеотидных остатков молекулы мРНК, которые соответствуют антикодонной области молекулы переноса РНК в процессе трансляции молекулы мРНК, или которые кодируют стоп-кодон. Таким образом, кодирующая область может включать нуклеотидные остатки, содержащие кодоны аминокислотных остатков, которые не присутствуют в зрелом белке, кодируемом молекулой мРНК (например, аминокислотные остатки в экспортной сигнальной последовательности белка).

"Дифференциальное снижение экспрессии" или "негативная регуляция" относится к уровням продукта биомаркера, которые по меньшей мере на 10% или более, например, на 20%, 30%, 40% или 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ниже или менее, и/или в 2,0 раза, 1,8 раза, 1,6 раза, 1,4 раза, 1,2 раза, 1,1 раза ниже или менее, чем уровни у контроля, и составляет любые и все целые числа или частные приращения этих чисел.

"Дифференциальное повышение экспрессии" или "позитивная регуляция" относится к уровням продукта биомаркера, которые по меньшей мере на 10% или более, например, на 20%, 30%, 40% или 50%, 60%, 70%, 80%, 90% выше или более, и/или в 1,1 раза, 1,2 раза, 1,4 раза, 1,6 раза, 1,8 раза, 2,0 раза выше или более, чем уровни у контроля, и составляет любые и все целые числа или частные приращения этих чисел.

Используемый в настоящем документе термин "комплементарный", относящийся к нуклеиновой кислоте, представляет собой широкое понятие комплементарности последовательностей областей двух цепей нуклеиновых кислот или двух областей одной и той же цепи нуклеиновой кислоты. Известно, что адениновый остаток первой области нуклеиновой кислоты способен образовывать специфические водородные связи ("спаривание оснований") с остатком второй области нуклеиновой кислоты, которая является антипараллельной первой области, если остатком является тимин или урацил. Аналогичным образом, известно, что цитозинный остаток первой цепи нуклеиновой кислоты способен образовывать пары оснований с остатком второй цепи нуклеиновой кислоты, которая является антипараллельной первой цепи, если остатком является гуанин. Первая область нуклеиновой кислоты является комплементарной второй области одной и той же или другой нуклеиновой кислоты, и если две области расположены антипараллельно друг другу, то по меньшей мере один нуклеотидный остаток первой области способен образовывать пары оснований с остатком второй области. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая область содержит первую часть, а вторая область содержит вторую часть, и если первая и вторая части расположены антипараллельно друг другу, то по меньшей мере приблизительно 50%, и/или по меньшей мере приблизительно 75%, или по меньшей мере приблизительно 90%, или по меньшей мере приблизительно 95% нуклеотидных остатков первой части способны образовывать пары оснований с нуклеотидными остатками во второй части. В некоторых вариантах осуществления изобретения, все нуклеотидные остатки первой части способны образовывать пары оснований с нуклеотидными остатками во второй части.

Используемый в настоящем документе термин "ДНК" определен как дезоксирибонуклеиновая кислота.

Термин "кодирующий" относится к специфическим последовательностям нуклеотидов в полинуклеотиде, таким как ген, кДНК или мРНК, имеющим природное свойство, позволяющее им служить в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих определенную последовательность нуклеотидов (то есть, рРНК, тРНК и мРНК) или определенную последовательность аминокислот и обладающих биологическими свойствами этих нуклеотидов и аминокислот. Таким образом, ген кодирует белок, если транскрипция и трансляция мРНК, соответствующей этому гену, способствует продуцированию белка в клетке или в другой биологической системе. Обе кодирующие цепи, нуклеотидные последовательности которых идентичны последовательности мРНК, и которые

обычно имеются в списках последовательностей, и не кодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут рассматриваться в настоящем документе как цепи, кодирующие белок или другой продукт этого гена или кДНК.

Если это не оговорено особо, то выражение "нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность" включает все нуклеотидные последовательности, которые представляют собой вырожденные варианты, и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Выражение "нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок или РНК", может также включать интроны, если только нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в некоторых вариантах содержать интрон(ы).

Термин "выделенный" означает "модифицированный" или "удаленный" из природного окружения. Так, например, нуклеиновая кислота или пептид, которые обычно присутствуют в нормальной среде у живого индивидуума, не являются "выделенными", но та же самая нуклеиновая кислота или пептид, которые были частично или полностью отделены от окружения, в котором они обычно присутствуют в природе, являются "выделенными". Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут присутствовать, в основном, в очищенной форме, либо они могут присутствовать в неприродном окружении, таком как, например, клетка-хозяин.

Используемый в настоящем документе термин "гибридома" означает клетку, происходящую от гибрида В-лимфоцита и его партнера по слиянию, такого как миеломная клетка. Гибридома может быть клонирована и может сохраняться бесконечно долгое время в клеточной культуре и обладает способностью продуцировать моноклональные антитела. Гибридома может также рассматриваться как гибридная клетка.

"Выделенная нуклеиновая кислота" означает сегмент или фрагмент нуклеиновой кислоты, который был отделен от последовательностей, фланкирующих этот сегмент в природе, то есть, фрагмент ДНК, который был удален из последовательностей, которые по своей природе являются смежными с этим фрагментом, то есть, последовательностей, смежных с фрагментом в геноме, в котором они присутствуют по своей природе. Этот термин также относится к нуклеиновым кислотам, которые были, по существу, очищены от других компонентов, связанных с нуклеиновой кислотой в природе, то есть, РНК или ДНК или белков, присутствующих в этой клетке в природе. Следовательно, этот термин включает, например, рекомбинантную ДНК, которую вводят в вектор, в автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус, или в геномную ДНК прокариота или эукариота, или которая существует как отдельная молекула (то есть, как кДНК или фрагмент геномной ДНК или кДНК, продуцированный посредством ПЦР или посредством гидролиза рестриктирующими ферментами) независимо от других последовательностей. Этот термин также включает рекомбинантную ДНК, которая является частью гибридного гена, кодирующего дополнительную полипептидную последовательность.

В контексте настоящего изобретения, широко распространенные основания нуклеиновых кислот имеют следующие сокращения. "А" означает аденозин, "С" означает цитозин, "G" означает гуанозин, "Т" означает тимидин, а "U" означает уридин.

Используемый в настоящем документе термин "полинуклеотид" определен как цепь нуклеотидов. Кроме того, нуклеиновые кислоты представляют собой нуклеотидные полимеры. Таким образом, используемые в настоящем документе термины "нуклеиновые кислоты" и "полинуклеотиды" являются синонимами. Исходя из общих знаний, специалисту известно, что нуклеиновые кислоты представляют собой полинуклеотиды, которые могут быть гидролизованы с образованием мономерных "нуклеотидов". Мономерные нуклеотиды могут быть гидролизованы в нуклеозиды. Используемыми в настоящем документе полинуклеотидами являются, но не ограничиваются ими, все последовательности нуклеиновой кислоты, полученные любыми методами, известными специалистам, включая, но не ограничиваясь ими, рекомбинантные методы, то есть, клонирование последовательностей нуклеиновой кислоты из рекомбинантной библиотеки или клеточного генома с применением стандартных методов клонирования и ПЦР и т.п., и методы синтеза.

Используемые в настоящем документе термины "пептид", "полипептид" и "белок" являются синонимами и означают соединение, состоящее из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, но максимальное число аминокислот, которое может содержать последовательность белка или пептида, не имеет конкретных ограничений. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, связанных друг с другом пептидными связями. Этот используемый в настоящем документе термин означает две коротких цепи, которые также обычно называются пептидами, олигопептидами и олигомерами и, например, более длинные цепи, которые в литературе называются белками многих типов. "Полипептидами" являются, например, биологически активные фрагменты, по существу, гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, гибридные белки и т.п. Полипептидами являются природные пептиды, рекомбинантные пептиды, синтетические пептиды или их комбинации.

Используемый в настоящем документе термин "потомство" означает последующее поколение или потомки и включает потомство млекопитающего, а также дифференцированные или недифференциро-

ванные клетки-потомки, происходящие от родительской клетки. В одном из применений, термин "потомство" означает клетки-потомки, которые являются генетически идентичными родительским клеткам. В другом применении, термин "потомство" означает клетки-потомки, которые являются генетически и фенотипически идентичными родительским клеткам. В еще одном применении, термин "потомство" означает клетки-потомки, которые были дифференцированы из родительской клетки.

Используемый в настоящем документе термин "РНК" определен как рибонуклеиновая кислота.

Используемый в настоящем документе термин "рекомбинантная ДНК" определен как ДНК, полученная путем присоединения фрагментов ДНК от различных источников.

Используемый в настоящем документе термин "рекомбинантный полипептид" определен как полипептид, полученный методами рекомбинантных ДНК.

Используемый в настоящем документе термин "конъюгированный" относится к ковалентному связыванию одной молекулы с другой молекулой.

Используемый в настоящем документе термин "вариант" означает последовательность нуклеиновой кислоты или пептидную последовательность, которая отличается от эталонной последовательности нуклеиновой кислоты или пептидной последовательности, соответственно, но сохраняет основные биологические свойства эталонной молекулы. Изменения в последовательности варианта нуклеиновой кислоты могут не приводить к модификации аминокислотной последовательности пептида, кодируемого эталонной нуклеиновой кислотой, или могут приводить к аминокислотным заменам, добавлениям, делециям, лигированию и усечениям. Изменения в последовательности пептидных вариантов обычно являются ограниченными или консервативными, а поэтому последовательности эталонного пептида и варианта, в целом, являются очень похожими, а во многих областях, идентичными. Аминокислотные последовательности варианта и эталонного пептида могут отличаться одной или более заменами, добавлениями и делециями в любых комбинациях. Вариант нуклеиновой кислоты или пептида может представлять собой природный вариант, такой как аллельный вариант, либо вариант, о котором не известно, существует ли он в природе. Не-природные варианты нуклеиновых кислот и пептидов могут быть получены методами мутагенеза или посредством прямого синтеза. В различных вариантах осуществления изобретения, последовательность варианта по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 85% идентична эталонной последовательности.

Используемый в настоящем документе термин "регуляция" может означать любой метод изменения уровня или активности субстрата. Неограничивающими примерами регуляции, если она относится к белку, являются воздействие на экспрессию (включая транскрипцию и/или трансляцию), воздействие на укладку, воздействие на разложение или метаболизм белка и воздействие на локализацию белка. Неограничивающими примерами регуляции, если она относится к ферменту, также является воздействие на ферментативную активность. "Регулятор" означает молекулу, активность которой включает воздействие на уровень или активность субстрата. Регулятор может быть прямым или опосредованным. Функция регулятора может заключаться в активации или ингибировании или какой-либо другой модуляции его субстрата.

Используемый в настоящем документе термин "окно сканирования" означает сегмент из ряда смежных положений, в котором последовательность может быть оценена независимо от любых фланкирующих последовательностей. Окно сканирования обычно сдвигают пошагово по всей длине оцениваемой последовательности для каждого нового и независимо оцениваемого сегмента. Пошаговый сдвиг может быть сделан на 1 или более, чем одно положение.

Используемый в настоящем документе термин "вектор" может означать последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую ориджин репликации. Вектором могут быть плаزمиды, бактериофаг, бактериальная искусственная хромосома или дрожжевая искусственная хромосома. Вектором может быть ДНК- или РНК-вектор. Вектор может представлять собой аутореплицирующийся внехромосомный вектор или вектор, который интегрируется в геном хозяина.

Интервалы: во всем описании изобретения, различные аспекты изобретения могут быть представлены в виде интервалов. Следует отметить, что описание в виде интервалов приводится лишь для удобства и краткости и не должно рассматриваться как строгое ограничение объема изобретения. В соответствии с этим, описание интервалов должно рассматриваться как конкретное описание всех возможных субинтервалов, а также отдельных численных величин, входящих в этот интервал. Так, например, описание интервала, такого как интервал от 1 до 6 должно рассматриваться как конкретно описанные субинтервалы, такие как интервалы от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т.п., а также численные величины, входящие в этот интервал, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. Это применимо независимо от ширины интервала.

Описание

Настоящее изобретение относится к ингибированию передачи сигнала комплемента и к подавлению развития комплемент-опосредуемых расстройств с использованием антитела против C5 человека. В од-

ном из своих вариантов настоящее изобретение относится к ингибированию каскада передачи сигнала комплемента посредством специфического нацеливания на белок компонента комплемента C5, или на фрагмент белка C5a или C5b. В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к способам лечения и профилактики воспалительных и аутоиммунных заболеваний, опосредуемых нежелательной, неконтролируемой и избыточной активацией комплемента. В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к лечению комплемент-опосредуемого заболевания или комплемент-опосредуемого расстройства у индивидуума посредством приведения в контакт индивидуума с анти-C5 антителом.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к способу лечения комплемент-опосредуемого заболевания или расстройства у индивидуума, включающему стадию введения указанному индивидууму анти-C5 антитела и, тем самым, ингибирования образования белка C5a или C5b и образования MAC. Примерами комплемент-опосредуемых патологий, которые могут быть подвергнуты лечению способами согласно изобретению, являются, но не ограничиваются ими, дегенерация желтого пятна (MD), возрастная дегенерация желтого пятна (AMD), ишемическое реперфузионное повреждение, артрит, ревматоидный артрит, волчанка, язвенный колит, инсульт, постхирургический системный воспалительный синдром, астма, аллергическая астма, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), синдром пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), тяжелая миастения, нейромиеелит зрительного нерва (NMO), рассеянный склероз, замедление функции трансплантата, отторжение, опосредуемое антителом, атипичский гемолитический уремический синдром (aHUS), окклюзия центральной вены сетчатки (CRVO), окклюзия центральной артерии сетчатки (CRAO), буллезный эпидермолиз, сепсис, трансплантация органов, воспаление (включая, но не ограничиваясь ими, воспаление, ассоциированное с операцией по сердечно-легочному шунтированию и с почечным диализом), С3-гломерулопатия, мембранозная нефропатия, IgA-нефропатия, гломерулонефрит (включая, но не ограничиваясь ими, гломерулонефрит, опосредуемый цитоплазматическим антителом против нейтрофилов (ANCA), волчаночный нефрит и их комбинации), ANCA-опосредованный васкулит, HUS, индуцированный Шига-токсином, и потеря плода, индуцированная антифосфолипидным антителом или любые их комбинации. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции и способы согласно изобретению могут быть применены для лечения индивидуума, включая индивидуумов, страдающих PNH, которые являются невосприимчивыми к лечению экулизумабом. В неограничивающем примере, некоторые индивидуумы могут иметь мутацию в альфа-цепи C5, которая может сообщать резистентность к лечению экулизумабом (см., Genetic variants in C5 and poor response to eculizumab. Nishimura J, et al., N Engl J Med. 2014 Feb 13;370 (7) :632-9).

Способность иммунной системы различать "свои" и "не свои" антигены является жизненно важной функцией иммунной системы как специфической защиты против инвазивных микроорганизмов. "Не свои" антигены представляют собой антигены на веществах, проникающих в организм или присутствующих в организме, которые имеют детектируемые отличия от собственных компонентов индивидуума или являются чужеродными для индивидуума, тогда как "свои" антигены представляют собой антигены, которые, у здорового индивидуума, не имеют детектируемых отличий от собственных компонентов индивидуума или не являются чужеродными для индивидуума. В различных вариантах способов активация комплемента, которая ингибируется, представляет собой активацию комплемента, запускаемую по меньшей мере одной из групп, состоящих из микробного антигена, небиологической чужеродной поверхности, модифицированной собственной ткани или их комбинациями. Одним из примеров небиологической чужеродной поверхности являются сосудистые трансплантаты, используемые в хирургической операции по кардиопульмональному шунтированию или для почечного диализа. Примерами измененных собственных тканей являются апоптотические, некротические и ишемические ткани и клетки или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-C5 антитела согласно изобретению ингибируют последующие эффекты активации альтернативного пути (AP), классического пути (CP) или лектинового пути (LP) комплемента. Вообще говоря, CP инициируются комплексами "антиген-антитело", LP активируется посредством связывания лектинов с молекулами сахара на микробных поверхностях, а AP является конститутивно активным на низком уровне, но может быстро амплифицироваться на поверхностях бактериальных клеток, вирусов и паразитарных клеток из-за отсутствия регуляторных белков. Клетки-хозяева обычно защищены от активации комплемента AP регуляторными белками. Но в некоторых случаях, например, в случае повреждения или отсутствия регуляторных белков, AP может также неконтролируемо активироваться на клетках-хозяевах, что может приводить к развитию заболевания или расстройства, опосредуемого комплементом. CP состоит из компонентов C1, C2, C4 и сходится с AP на стадии активации C3. LP состоит из лектинов, связывающихся с маннозой (MBL), и MBL-ассоциированных сериновых протеаз (Masps), и имеет общие положения с CP, состоящим из компонентов C4 и C2. AP состоит из компонентов C3 и нескольких факторов, таких как фактор В, фактор D, пропердин, C5 и жидкофазный фактор-регулятор Н. Активация комплемента состоит из трех стадий: (а) распознавания, (b) ферментативной активации и (с) мембранной атаки, приводящей к гибели клеток. Первая фаза активации комплемента CP начинается с C1. C1 состоит из трех различных белков: субъединицы распознавания, C1q, и субкомпонентов сериновой протеазы, C1g и C1s, которые связываются друг с другом в тетрамерном комплексе, зависящем от кальция, C1r2s2. Интактный комплекс C1 необходим для

физиологической активации C1. Активация достигается в том случае, если интактный комплекс C1 связывается с иммуноглобулином, образующим комплекс с антигеном. Такое связывание активирует C1s, что в свою очередь, приводит к расщеплению белков C4 и C2 и к образованию C4a и C4b, а также C2a и C2b. Фрагменты C4b и C2a объединяются с образованием C3-конвертазы, C4b2a, что в свою очередь, приводит к расщеплению C3 и к образованию C3a и C3b. Активация LP инициируется MBL, связывающимся с некоторыми сахарами на поверхности-мишени и запускает активацию MBL-ассоциированных сериновых протеаз (MASP), что будет приводить к расщеплению C4 и C2 по механизму, аналогичному активации C1s в CP, и к образованию C3-конвертазы C4b2a. Таким образом, CP и LP активируются по различным механизмам, но все они имеют одинаковые компоненты C4 и C2 и оба эти пути приводят к образованию одной и той же C3-конвертазы, C4b2a. Расщепление C3 под действием C4b2a с образованием C3b и C3a является ключевым событием пути комплемента по двум причинам. Во-первых, оно инициирует петлю амплификации AP, поскольку C3b, осаждаемый на поверхности, представляет собой центральное промежуточное вещество AP. Оба C3a и C3b играют биологически важную роль. C3a представляет собой провоспалительный белок, а C3a вместе с C5a представляют собой анафилатоксины. C3b и продукты его последующего расщепления также связываются с рецепторами комплемента, присутствующими на нейтрофилах, эозинофилах, моноцитах и макрофагах, что облегчает фагоцитоз и клиренс C3b-опсонизированных частиц. И наконец, C3b может ассоциироваться с C4b2a с образованием C5-конвертазы CP и LP и с активацией терминальной последовательности комплемента, что будет приводить к продуцированию C5a, то есть, сильного провоспалительного медиатора, и к сборке литического мембрано-атакующего комплекса (MAC), C5-C9.

В одном из вариантов осуществления изобретения, активность пути комплемента, которая ингибируется способом согласно изобретению, представляет собой активацию пути комплемента, индуцированную по меньшей мере одной из групп, выбранных из липополисахарида (LPS), липоолигосахарида (LOS), молекулярных паттернов, ассоциированных с патогеном (PAMP) и молекулярных паттернов, ассоциированных с риском (DAMP). В другом варианте осуществления изобретения, активность передачи сигнала комплемент, которая ингибируется способом согласно изобретению, представляет собой образование белка C5a. В другом варианте осуществления изобретения, активность передачи сигнала комплемента, которая ингибируется способом согласно изобретению, представляет собой образование белка C5b. В другом варианте осуществления изобретения, активность передачи сигнала комплемента, которая ингибируется способом согласно изобретению, представляет собой образование MAC. В другом варианте осуществления изобретения, активность передачи сигнала комплемента, которая ингибируется способом согласно изобретению, зависит от C5.

В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу ингибирования инициации терминальной активации комплемента у индивидуума, включающему стадию введения указанному индивидууму анти-C5 антитела, и тем самым, ингибирования инициации терминальной активации комплемента в результате активации CP, LP или AP у индивидуума. Примерами этих вариантов являются пациенты с PNH, страдающие гемолизом, опосредуемым комплементом, и индивидуумы, страдающие комплемент-опосредуемым aHUS, астмой, ишемическим/реперфузионным повреждением, ревматоидным артритом и ANCA-опосредуемыми болезнями почек. В различных вариантах осуществления изобретения, заболеваниями и расстройствами, которые могут быть подвергнуты лечению с использованием композиций и способов согласно изобретению, являются, но не ограничиваются ими, комплемент-опосредуемый гемолиз, комплемент-опосредуемый aHUS, C3-гломерулопатия, нейромиелиит зрительного нерва, тяжелая миастения, астма, ишемическое/реперфузионное повреждение, ревматоидный артрит и ANCA-опосредуемые заболевания или расстройства почек.

В различных своих других вариантах, настоящее изобретение относится к способам идентификации потенциального анти-C5 антитела, обладающего действием, ингибирующим передачу сигнала комплемента. Один из таких способов включает стадии: а) покрытия планшета липополисахаридом (LPS); б) промывки планшета для удаления несвязанного LPS; в) добавления альбумина бычьей сыворотки (BSA) в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS); г) промывки планшета для удаления несвязанного BSA; д) добавления смеси соединения анти-C5 антитела-кандидата, которое было предварительно инкубировано с сывороткой и смешано, в нормальную человеческую сыворотку; е) промывки планшета; ж) добавления ПХ-конъюгированного антитела против человеческого C3; з) промывки планшета для удаления несвязанного антитела; и) добавления реагента, который является субстратом для ПХ; л) добавления серной кислоты для прекращения реакции; м) измерения оптической плотности на 450 нм; н) сравнения оптической плотности планшета, содержащего соединение анти-C5 антитела-кандидата, с оптической плотностью позитивного контроля для сравнения и негативного контроля для сравнения; причем, анти-C5 антитело идентифицируют по снижению оптической плотности по сравнению с оптической плотностью позитивного контроля для сравнения.

Анти-C5 антитела

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение включает композиции, содержащие антитело, которое специфически связывается с C5. В одном из вариантов осуществления изобретения, анти-C5 антителом является поликлональное антитело. В другом варианте осуществления изобретения анти-C5 ан-

тителом является моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-C5 антителом является химерное антитело. В других вариантах осуществления изобретения анти-C5 антителом является гуманизованное антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения антителом является фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения C5 представляет собой человеческий C5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывание антитела или фрагмента антитела с C5 человека ассоциируется со снижением образования C5a или C5b и образования MAC в пути активации комплемента в интактном организме. В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к белку или полипептиду, способному связываться с C5 человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или фрагмент антитела, белок или полипептид связываются с соответствующей частью или фракцией или с эпитопом C5 человека; и связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или белка или полипептида с соответствующей частью C5 человека ассоциируется со снижением образования C5a или C5b и образования MAC в интактном организме.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, связывающееся с C5 человека или фрагмент антитела, связывающегося с C5, дополнительно конъюгируют с белком, пептидом или другим соединением. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, связывающееся с C5 человека, или его фрагмент конъюгируют с белком, пептидом или другим соединением. В некоторых вариантах осуществления изобретения белок, пептид или другое соединение, с которыми конъюгировано антитело, связывающееся с C5 человека, или фрагмент этого антитела, представляют собой нацеливающую молекулу (то есть, нацеливающую молекулу, специфически связывающуюся с молекулой, не являющейся человеческим C5). В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок, пептид или другое соединение, с которыми конъюгировано антитело, связывающееся с C5 человека, или фрагмент этого антитела, представляют собой эффекторную молекулу (например, цитотоксическую молекулу).

В одном из вариантов осуществления изобретения анти-C5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат по меньшей мере одну из CDR, выбранных из группы, состоящей из: VH-CDR1: SEQ ID NO:3; VH-CDR2: SEQ ID NO:4; VH-CDR3: SEQ ID NO:5; VL-CDR1: SEQ ID NO:8; VL-CDR2: SEQ ID NO:9; и VL-CDR3: SEQ ID NO:10, или их варианта или вариантов. В другом варианте осуществления изобретения, анти-C5 антитело содержит все CDR, выбранные из группы, состоящей из: VH-CDR1: SEQ ID NO:3; VH-CDR2: SEQ ID NO:4; VH-CDR3: SEQ ID NO:5; VL-CDR1: SEQ ID NO:8; VL-CDR2: SEQ ID NO:9; и VL-CDR3: SEQ ID NO:10, или их варианта или вариантов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-C5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH-CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 или ее вариант, содержащие приблизительно до 3 (например, приблизительно любые из 1, 2 или 3) аминокислотных замен; и VL-CDR1: SEQ ID NO:8 или ее вариант, содержащие приблизительно до 3 (например, приблизительно любые из 1, 2 или 3) аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления изобретения, анти-C5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат: VH-CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3; и VL-CDR1: SEQ ID NO:8.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-C5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH-CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4 или ее вариант, содержащие приблизительно до 3 (например, приблизительно любые из 1, 2 или 3) аминокислотных замен; и VL-CDR2: SEQ ID NO:9 или ее вариант, содержащие приблизительно до 3 (например, приблизительно любые из 1, 2 или 3) аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-C5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат: VH-CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4; и VL-CDR2: SEQ ID NO:9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-C5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH-CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 или ее вариант, содержащие приблизительно до 3 (например, приблизительно любые из 1, 2 или 3) аминокислотных замен; и VL-CDR3: SEQ ID NO:10 или ее вариант, содержащие приблизительно до 3 (например, приблизительно любые из 1, 2 или 3) аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления изобретения, анти-C5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат: VH-CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5; и VL-CDR3: SEQ ID NO:10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-C5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH-CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 или ее вариант, содержащие приблизительно до 3 (например, приблизительно любые из 1, 2 или 3) аминокислотных замен; VH-CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4 или ее вариант, содержащие приблизительно до 3 (например, приблизительно любые из 1, 2 или 3) аминокислотных замен; VH-CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 или ее вариант, содержащие приблизительно до 3 (например, приблизительно любые из 1, 2 или 3) аминокислотных замен; VL-CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8 или ее вариант, содержащие приблизительно до 3 (например, приблизительно любые из 1, 2 или 3) аминокислотных замен; VL-CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9 или ее вариант, содержащие приблизительно до 3 (например, приблизительно любые из 1, 2 или 3) аминокислотных замен; и VL-CDR3, вклю-

SEQ ID NO:73. В некоторых вариантах осуществления изобретения моноклональное анти-C5 антитело является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения моноклональным анти-C5 антителом является химерное антитело.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антителами являются химерные антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против C5 человека может содержать константные домены человеческой легкой цепи и человеческой тяжелой цепи в комбинации с последовательностями CDR варибельной области, описанными выше. Специалист в данной области может получить и синтезировать химерное антитело известными методами замены соответствующих доменов представляющих интерес специфических антител. Такое антитело может быть легко получено путем присоединения гетерогенных доменов антитела и включения одной или более последовательностей CDR, описанных в настоящей заявке. С применением известной рекомбинантной технологии можно получить и синтезировать рекомбинантное антитело, содержащее константные области тяжелой и легкой цепей, кодируемые последовательностями нуклеиновой кислоты константных областей человеческой тяжелой и легкой цепей; и варибельные области тяжелой и легкой цепей, содержащие CDR, кодируемые последовательностями нуклеиновой кислоты, соответствующими последовательностям CDR, описанным в настоящей заявке. Специалист в данной области может получить антитело против C5 человека, содержащее одну или более последовательностей CDR, описанных в настоящей заявке, где части легкой цепи или части тяжелой цепи, взятые отдельно, заменяют областями антитела, принадлежащего к другому виду, такому как например, человек. Человеческое антитело против C5 человека, содержащее варибельные области, имеющие одну или более последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NN: 3-5, 8-10, 13-15, 18-20, 23-25, 28-29, 32-34, 37-39, 42-44, 47-49, 52-54 и 57-59, или их варианта или вариантов в комбинации со структурными элементами мышиноного или не-мышиноного антитела, находящимися за пределами областей CDR, могут быть получены рутинными методами, известными специалистам. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела или фрагменты антител также подвергаются гуманизации известными методами.

В различных вариантах осуществления изобретения любое из описанных в настоящем документе антител согласно изобретению, имеющих любые описанные в настоящем документе варибельные области, может содержать константную тяжелую цепь человеческого IgG4. SEQ ID NO:104 представляет собой пример аминокислотной последовательности константной тяжелой цепи человеческого IgG4. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело согласно изобретению содержит константную тяжелую цепь человеческого IgG4, имеющую мутацию S228P. SEQ ID NO:60 является примером аминокислотной последовательности константной тяжелой цепи человеческого IgG4, имеющей мутацию S228P.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-C5 антитело включает антитело, имеющее аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 85% (например, по меньшей мере приблизительно на любые из 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентична последовательностям CDR, описанным и перечисленным в настоящей заявке в SEQ ID NN 3-5, 8-10, 13-15, 18-20, 23-25, 28-29, 32-34, 37-39, 42-44, 47-49, 52-54 и 57-59.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение охватывает анти-C5 антитело, имеющее последовательности CDR, которые по меньшей мере приблизительно на 85% (например, по меньшей мере приблизительно на любые из 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичны последовательностям CDR, описанным выше. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против C5 человека имеет варибельную (vH) область тяжелой цепи и варибельную (vL) область легкой цепи, где область vH имеет аминокислотную последовательность, которая более, чем приблизительно на 90% (например, более, чем приблизительно на любые из 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентична последовательностям, выбранным из SEQ ID NN 2, 12, 22, 31, 41, 51, 63 и 68, и где область vL имеет аминокислотную последовательность, которая более, чем приблизительно на 90% (например, более, чем приблизительно на любые из 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентична последовательностям, выбранным из SEQ ID NN 7, 17, 27, 36, 46, 56 и 73.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или фрагмент антитела являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификации включают присоединение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к частям другого белка или фрагмента белка. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его фрагмент согласно изобретению модифицируют для увеличения его времени полужизни в кровотоке *in vivo*. Так, например, фрагмент антитела может быть присоединен к молекуле FcRn, которая также известна как неонатальный Fc-рецептор для стабилизации антитела *in vivo* (Nature Reviews Immunology 7:715-725). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгируют (например, связывают) с эффекторной молекулой и/или с другой нацеливающей молекулой (такой как антитело или фрагмент антитела, распознающие другую молекулу, другой антиген или другой эпитоп).

Специалист в данной области может получить одноцепочечный варибельный фрагмент, связы-

лотой в домене MG5 β-цепи C5. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его связывающая часть связываются по меньшей мере с одной аминокислотой в домене MG6 β-цепи C5.

В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна (например, по меньшей мере 1, 2, 3 или 4) аминокислота SEQ ID NO:84 присутствует в эпитопе антитела против C5 человека. В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна (например, по меньшей мере 1, 2, 3 или 4) аминокислота SEQ ID NO:85 присутствует в эпитопе антитела против C5 человека. В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна (например, по меньшей мере 1, 2, 3 или 4) аминокислота SEQ ID NO:86 присутствует в эпитопе антитела против C5 человека. В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна (например, по меньшей мере 1, 2, 3 или 4) аминокислота SEQ ID NO:87 присутствует в эпитопе антитела против C5 человека. В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна (например, по меньшей мере 1, 2, 3 или 4) аминокислота SEQ ID NO:88 присутствует в эпитопе антитела против C5 человека. В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна (например, по меньшей мере 1, 2, 3 или 4) аминокислота SEQ ID NO:89 присутствует в эпитопе антитела против C5 человека.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело или его связывающий фрагмент согласно изобретению связываются по меньшей мере с одной (например, по меньшей мере с 1, 2, 3 или 4) из аминокислот SEQ ID NO:84. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело или его связывающий фрагмент согласно изобретению связываются по меньшей мере с одной (например, по меньшей мере с 1, 2, 3 или 4) из аминокислот SEQ ID NO:85. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело или его связывающий фрагмент согласно изобретению связываются по меньшей мере с одной (например, по меньшей мере с 1, 2, 3 или 4) из аминокислот SEQ ID NO:86. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело или его связывающий фрагмент согласно изобретению связываются по меньшей мере с одной (например, по меньшей мере с 1, 2, 3 или 4) из аминокислот SEQ ID NO:87. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело или его связывающий фрагмент согласно изобретению связываются по меньшей мере с одной (например, по меньшей мере с 1, 2, 3 или 4) из аминокислот SEQ ID NO:88. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело или его связывающий фрагмент согласно изобретению связываются по меньшей мере с одной (например, по меньшей мере с 1, 2, 3 или 4) из аминокислот SEQ ID NO:89.

Скрининг-анализы

Изобретение было применено в различных скрининг-анализах, включая определение того факта, может ли анти-C5 антитело-кандидат ингибировать активность комплемента.

В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень активности комплемента в присутствии анти-C5 антитела-кандидата сравнивают с активностью комплемента, детектируемой в позитивном контроле для сравнения. Позитивный контроль для сравнения включает активацию комплемента в присутствии добавленного тестируемого соединения. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-C5 антитело-кандидат идентифицируют как ингибитор комплемента, если активность комплемента в присутствии анти-C5 антитела-кандидата составляет менее, чем приблизительно 70% от активности комплемента, детектируемой в позитивном контроле для сравнения; и это соответствует более, чем приблизительно 30% ингибированию активности комплемента в присутствии тестируемого соединения. В других вариантах осуществления изобретения анти-C5 антитело-кандидат идентифицируют как ингибитор комплемента, если активность комплемента в присутствии анти-C5 антитела-кандидата составляет менее, чем приблизительно 80% от активности комплемента, детектируемой в позитивном контроле для сравнения; и это соответствует более, чем приблизительно 20% ингибированию активности комплемента в присутствии тестируемого соединения. В других вариантах осуществления изобретения анти-C5 антитело-кандидат идентифицируют как ингибитор комплемента, если активность комплемента в присутствии анти-C5 антитела-кандидата составляет менее, чем приблизительно 90% от активности комплемента, детектируемой в позитивном контроле для сравнения; и это соответствует более, чем приблизительно 10% ингибированию активности комплемента в присутствии тестируемого соединения. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень ингибирования комплемента анти-C5 антителом-кандидатом сравнивают с уровнем ингибирования, детектируемым в негативном контроле для сравнения.

Подходящими способами согласно изобретению являются иммуноанализы в различных форматах, включая иммуноанализы на конкурентное и неконкурентное связывание, анализы на захват антигена, "сэндвич"-анализы с двумя антителами и "сэндвич"-анализы с тремя антителами (Self et al., 1996, Curr. Opin. Biotechnol. 7:60-65). Настоящее изобретение не должно ограничиваться известными или неизвестными анализами любого типа, при условии, что такой анализ будет подходящим для детектирования ингибирования комплемента.

В способах согласно изобретению используются твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA). Фермент, такой как, но не ограничивающийся ими, пероксидаза хрена (ПХ), щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или уреазы, может быть присоединен, например, к анти-C3 антителу или ко "второму" антителу для применения в способе согласно изобретению. Система детектирования с использованием

пероксидазы хрена может быть использована, например, вместе с хромогенным субстратом тетраметилбензидином (ТМВ), в результате чего может быть получен растворимый продукт в присутствии пероксида водорода, который детектируется на 450 нм. Другими подходящими системами на основе ферментов являются, например, система детектирования на основе щелочной фосфатазы, которая может быть использована вместе с хромогенным субстратом п-нитрофенилфосфатом, в результате чего может быть получен растворимый продукт, легко детектируемый на 405 нм. Аналогичным образом, может быть использована система детектирования на основе бета-галактозидазы вместе с хромогенным субстратом о-нитрофенил-бета-D-галактопиранозидом (ONPG), в результате чего может быть получен растворимый продукт, детектируемый на 410 нм. Альтернативно, система детектирования на основе уреазы может быть использована вместе с субстратом, таким как мочевино-бромкрезоловый пурпурный (Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO). Используемые в настоящем документе "первые" и "вторые" антитела, связанные с ферментом, могут быть получены из любых различных коммерчески доступных источников.

Для детектирования ингибирования AP также применяется хемилюминесцентное детектирование. Хемилюминесцентные "вторые" антитела могут быть получены из любых различных коммерчески доступных источников.

Для детектирования ингибирования AP также применяется флуоресцентное детектирование. Подходящими флуорохромами являются, но не ограничиваются ими, DAPI, флуоресцеин, Hoechst 33258, R-фиикоцианин, В-фиикоэритрин, R-фиикоэритрин, родамин, тexasский красный и антитела, меченные лиссамином, флуоресцеином или родамином.

В способах согласно изобретению также применяются радиоиммуноанализы (РИА). Такие анализы хорошо известны специалистам и описаны, например, Brophy et al. (1990, Biochem. Biophys. Res. Comm. 167:898-903) и Guehot et al. (1996, Clin. Chem. 42:558-563). Радиоиммуноанализы осуществляют, например, с использованием "первого" или "второго" антитела, меченного иодом-125 (Harlow et al., supra, 1999).

Сигнал, подаваемый детектируемым антителом, анализируют, например, на спектрофотометре для детектирования цвета, который дает хромогенный субстрат; на счетчике радиации для детектирования излучения, таком как гамма-счетчик для детектирования иода-125; или на флуориметре для детектирования флуоресценции в присутствии света на определенной длине волны. В случае иммуноферментного анализа количественный анализ проводят на спектрофотометре. Следует отметить, что анализы согласно изобретению могут быть осуществлены вручную или, при необходимости, они могут быть осуществлены автоматически, а передача сигнала множеством образцов может быть детектирована одновременно во многих коммерчески доступных системах.

Способы согласно изобретению также включают применение иммуноанализов на основе капиллярного электрофореза (CEIA), который может быть проведен автоматически, если это необходимо. Иммуноанализы могут быть также проведены в комбинации с флуоресцентным анализом с лазерной индукцией, как описано, например, Schmalzing et al. (1997, Electrophoresis 18:2184-2193) and Bao (1997, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. 699:463-480). Иммуноанализы на основе липосом, такие как иммуноанализы, проводимые путем введения липосом в проточном режиме, и иммуносенсорные анализы на основе липосом могут быть также проведены в соответствии со способами согласно изобретению (Rongen et al., 1997, J. Immunol. Methods 204:105-133).

Для определения уровня ингибирования комплемента в способах согласно изобретению может быть также применен количественный

Вестерн-блот-анализ. Вестерн-блоты количественно оценивают хорошо известными методами, такими как сканирующая денситометрия (Parra et al., 1998, J. Vase. Surg. 28:669-675).

Способы введения

Способы согласно изобретению включают введение терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного анти-C5 антитела или его связывающего фрагмента (таких как любые антитела или их фрагменты, описанные в настоящей заявке) индивидууму, идентифицированному как индивидуум, страдающий заболеванием или расстройством, опосредуемым комплементом. В одном из вариантов осуществления изобретения, индивидуумом является млекопитающее, имеющее систему комплемента. В одном из вариантов осуществления изобретения, индивидуумом является человек. В различных вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одно анти-C5 антитело или его связывающий фрагмент вводят местно, регионарно или системно.

В различных вариантах осуществления изобретения заболевание или расстройство представляет собой заболевание или расстройство, по меньшей мере выбранное из группы, состоящей из дегенерации желтого пятна (MD), возрастной дегенерации желтого пятна (AMD), ишемического реперфузионного повреждения, артрита, ревматоидного артрита, астмы, аллергической астмы, волчанки, язвенного колита, инсульта, постхирургического системного воспалительного синдрома, астмы, аллергической астмы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), синдрома пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), тяжелой миастении, нейромиелита зрительного нерва (NMO), рассеянного склероза, замедления функции трансплантата, отторжения, опосредуемого антителом, атипического гемолитического уремического синдрома (aHUS), окклюзии центральной вены сетчатки (CRVO), окклюзии центральной арте-

рии сетчатки (CRAO), буллезного эпидермолиза, сепсиса, трансплантации органов, воспаления (включая, но не ограничиваясь ими, воспаление, ассоциированное с операцией по сердечно-легочному шунтированию и почечным диализом), С3-гломерулопатии, мембранозной нефропатии, IgA-нефропатии, гломерулонефрита (включая, но не ограничиваясь ими, гломерулонефрит, опосредуемый цитоплазматическим антителом против нейтрофилов (ANCA), волчаночный нефрит и их комбинации), ANCA-опосредованного васкулита, HUS, индуцированного Шига-токсином, и потери плода, индуцированной антифосфолипидным антителом или любых их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения, AP-опосредованным заболеванием является С3-гломерулопатия. В некоторых вариантах осуществления изобретения AP-опосредованным заболеванием является дегенерация желтого пятна, такая как возрастная дегенерация желтого пятна. В одном из вариантов осуществления изобретения введение анти-С5 антитела ингибирует продуцирование белка С5а или С5b. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции и способы согласно изобретению могут быть применены для лечения индивидуума, включая индивидуумов, страдающих PNH, которые являются невосприимчивыми к лечению экулизумабом. В неограничивающем примере некоторые индивидуумы могут иметь мутацию в альфа-цепи С5, которая может сообщать резистентность к лечению экулизумабом (см., Genetic variants in C5 and poor response to eculizumab. Nishimura J, et al., N Engl J Med. 2014 Feb 13;370 (7) :632-9).

Способы согласно изобретению могут включать введение по меньшей мере одного анти-С5 антитела или его связывающего фрагмента, однако, настоящее изобретение никоим образом не должно ограничиваться описанными в настоящем документе анти-С5 антителами и может включать любое анти-С5 антитело, как известное, так и неизвестное, которое ослабляет и снижает активацию комплемента.

Способ согласно изобретению включает введение терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного анти-С5 антитела или его связывающего фрагмента индивидууму, где композиция согласно изобретению включает по меньшей мере одно анти-С5 антитело или его связывающий фрагмент, отдельно или в комбинации по меньшей мере с одним другим терапевтическим средством. Настоящее изобретение может быть использовано в комбинации с другими способами лечения, такими как, например, противовоспалительная терапия и т.п. Примерами противовоспалительной терапии, которая может быть использована в комбинации со способами согласно изобретению, являются, например, терапия с использованием стероидных лекарственных средств, а также терапия с использованием нестероидных лекарственных средств.

Способ согласно изобретению включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества анти-С5 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых своих вариантах настоящее изобретение включает способ лечения С5-ассоциированных заболеваний посредством подавления регуляции сигнала комплемента путем введения терапевтически эффективного количества антитела согласно изобретению или терапевтически эффективного количества его антигенсвязывающего фрагмента так, чтобы у индивидуума наблюдалось снижение образования С5а или С5b или MAC. В некоторых вариантах осуществления изобретения настоящее изобретение включает способ лечения С5-ассоциированных заболеваний посредством подавления регуляции сигнала комплемента путем введения терапевтически эффективного количества антитела или фрагмента антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения настоящее изобретение включает способ лечения С5-ассоциированных заболеваний посредством подавления регуляции сигнала комплемента путем введения индивидууму эффективного количества антитела, фрагмента антитела, полипептида, пептида и конъюгированного пептида так, чтобы у индивидуума наблюдалось снижение активности пути активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ лечения включает системное введение индивидууму эффективной дозы антитела или фрагмента антитела так, чтобы у индивидуума наблюдалось системное снижение образования С5а или С5b или MAC.

Фармацевтические композиции, подходящие для осуществления изобретения, могут быть введены для доставки дозы, составляющей по меньшей мере приблизительно 1 нг/кг, по меньшей мере приблизительно 5 нг/кг, по меньшей мере приблизительно 10 нг/кг, по меньшей мере приблизительно 25 нг/кг, по меньшей мере приблизительно 50 нг/кг, по меньшей мере приблизительно 100 нг/кг, по меньшей мере приблизительно 500 нг/кг, по меньшей мере приблизительно 1 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 5 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 10 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 25 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 50 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 100 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 500 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 1 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 5 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 10 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 25 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 50 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 100 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 200 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 300 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 400 мг/кг, и по меньшей мере приблизительно 500 мг/кг массы тела индивидуума. В одном из вариантов осуществления изобретения, в соответствии с настоящим изобретением, индивидууму вводят дозу так, чтобы концентрация анти-С5 антитела согласно изобретению составляла по меньшей мере приблизительно 1 пМ, по меньшей мере приблизительно 10 пМ, по меньшей мере приблизительно 100 пМ, по меньшей мере приблизительно 1 нМ, по меньшей мере приблизительно 10 нМ, по меньшей мере приблизительно 100 нМ, по меньшей мере приблизительно 1 мкМ, по меньшей мере приблизительно 2 мкМ, по

меньшей мере приблизительно 3 мкМ, по меньшей мере приблизительно 4 мкМ, по меньшей мере приблизительно 5 мкМ, по меньшей мере приблизительно 6 мкМ, по меньшей мере приблизительно 7 мкМ, по меньшей мере приблизительно 8 мкМ, по меньшей мере приблизительно 9 мкМ и по меньшей мере приблизительно 10 мкМ. В другом варианте осуществления изобретения, в настоящем изобретении рассматривается введение дозы индивидууму так, чтобы концентрация анти-С5 антитела согласно изобретению в плазме составляла в пределах по меньшей мере приблизительно 1 пМ, по меньшей мере приблизительно 10 пМ, по меньшей мере приблизительно 100 пМ, по меньшей мере приблизительно 1 нМ, по меньшей мере приблизительно 10 нМ, по меньшей мере приблизительно 100 нМ, по меньшей мере приблизительно 1 мкМ, по меньшей мере приблизительно 2 мкМ, по меньшей мере приблизительно 3 мкМ, по меньшей мере приблизительно 4 мкМ, по меньшей мере приблизительно 5 мкМ, по меньшей мере приблизительно 6 мкМ, по меньшей мере приблизительно 7 мкМ, по меньшей мере приблизительно 8 мкМ, по меньшей мере приблизительно 9 мкМ и по меньшей мере приблизительно 10 мкМ.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция, используемая для осуществления настоящего изобретения, может быть введена для доставки дозы, составляющей не более, чем приблизительно 1 нг/кг, не более, чем приблизительно 5 нг/кг, не более, чем приблизительно 10 нг/кг, не более, чем приблизительно 25 нг/кг, не более, чем приблизительно 50 нг/кг, не более, чем приблизительно 100 нг/кг, не более, чем приблизительно 500 нг/кг, не более, чем приблизительно 1 мкг/кг, не более, чем приблизительно 5 мкг/кг, не более, чем приблизительно 10 мкг/кг, не более, чем приблизительно 25 мкг/кг, не более, чем приблизительно 50 мкг/кг, не более, чем приблизительно 100 мкг/кг, не более, чем приблизительно 500 мкг/кг, не более, чем приблизительно 1 мг/кг, не более, чем приблизительно 5 мг/кг, не более, чем приблизительно 10 мг/кг, не более, чем приблизительно 25 мг/кг, не более, чем приблизительно 50 мг/кг, не более, чем приблизительно 100 мг/кг, не более, чем приблизительно 200 мг/кг, не более, чем приблизительно 300 мг/кг, не более, чем приблизительно 400 мг/кг, и не более, чем приблизительно 500 мг/кг массы тела индивидуума. В одном из вариантов осуществления изобретения, в соответствии с настоящим изобретением, индивидууму вводят дозу так, чтобы концентрация анти-С5 антитела согласно изобретению у индивидуума составляла не более, чем приблизительно 1 пМ, не более, чем приблизительно 10 пМ, не более, чем приблизительно 100 пМ, не более, чем приблизительно 1 нМ, не более, чем приблизительно 10 нМ, не более, чем приблизительно 100 пМ, не более, чем приблизительно 1 мкМ, не более, чем приблизительно 2 мкМ, не более, чем приблизительно 3 мкМ, не более, чем приблизительно 4 мкМ, не более, чем приблизительно 5 мкМ, не более, чем приблизительно 6 мкМ, не более, чем приблизительно 7 мкМ, не более, чем приблизительно 8 мкМ, не более, чем приблизительно 9 мкМ и не более, чем приблизительно 10 мкМ. В другом варианте осуществления изобретения, в настоящем изобретении рассматривается введение дозы индивидууму так, чтобы концентрация анти-С5 антитела согласно изобретению в плазме индивидуума составляла в пределах не более, чем приблизительно 1 пМ, не более, чем приблизительно 10 пМ, не более, чем приблизительно 100 пМ, не более, чем приблизительно 1 нМ, не более, чем приблизительно 10 нМ, не более, чем приблизительно 100 нМ, не более, чем приблизительно 1 мкМ, не более, чем приблизительно 2 мкМ, не более, чем приблизительно 3 мкМ, не более, чем приблизительно 4 мкМ, не более, чем приблизительно 5 мкМ, не более, чем приблизительно 6 мкМ, не более, чем приблизительно 7 мкМ, не более, чем приблизительно 8 мкМ, не более, чем приблизительно 9 мкМ и не более, чем приблизительно 10 мкМ. Также рассматриваются интервалы доз между любыми указанными в настоящем документе дозами.

Обычно дозы, которые могут быть введены способом согласно изобретению индивидууму, а в некоторых вариантах, человеку, составляют в пределах от 0,5 мкг до приблизительно 50 мг на килограмм массы тела индивидуума. Точно вводимая доза варьируется в зависимости от любого ряда факторов, включая, но не ограничиваясь ими, тип индивидуума и тип патологического состояния, подвергаемого лечению, возраст индивидуума и способ введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, доза соединения варьируется приблизительно от 1 мкг до приблизительно 10 мг на килограмм массы тела индивидуума. В других вариантах осуществления изобретения, доза варьируется приблизительно от 3 мкг до приблизительно 1 мг на килограмм массы тела индивидуума.

Антитело может быть введено с частотой несколько раз в день, либо оно может быть введено менее часто, например, один раз в день, два раза в день, три раза в день, один раз в две недели, два раза в две недели, три раза в две недели, один раз в месяц, два раза в месяц, три раза в месяц или даже еще реже, например, один раз в несколько месяцев или даже один или несколько раз в год или реже. Частота введения дозы может быть определена самим специалистом и зависит от любого ряда факторов, таких как, но не ограничивающихся ими, тип и тяжесть заболевания, подвергаемого лечению, тип и возраст индивидуума и т.п. Состав фармацевтических композиций может быть приготовлен любым методом, известным специалистам в области фармакологии, или методом, который будет разработан в будущем. В общих чертах, такие способы приготовления включают стадию приведения в контакт активного ингредиента с носителем или с одним или более другими вспомогательными ингредиентами, а затем, если это необходимо или желательно, придания формы продукту или его упаковки в виде нужной одноразовой или дробной унифицированной дозы.

Хотя приведенное в настоящем документе описание фармацевтических композиций относится,

главным образом, к фармацевтическим композициям, которые являются подходящими для введения патентованного лекарственного средства человеку, однако, следует отметить, что такие композиции могут быть введены индивидуумам всех видов. Модификация фармацевтических композиций, подходящих для введения человеку так, чтобы эти композиции могли быть введены другим индивидуумам, хорошо известна специалистам, и фармаколог-ветеринар общей практики может самостоятельно разработать и осуществить такую модификацию путем простого экспериментирования, если это необходимо. Индивидуумами, которым вводят фармацевтические композиции согласно изобретению, являются, но не ограничиваются ими, человек и другие приматы, млекопитающие, включая млекопитающих, представляющих коммерческий интерес, таких как приматы, не являющиеся человеком, крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, кошки и собаки.

Фармацевтические композиции, которые могут быть использованы в способах согласно изобретению, могут быть приготовлены, упакованы или проданы в виде препаратов, подходящих для офтальмического, перорального, ректального, вагинального, парентерального, местного, внутривенного, интраназального, трансбуккального, внутривидеального, интравитреального, внутримышечного, интрадермального и внутривенного введения. Другие рассматриваемые препараты включают исследуемые наночастицы, липосомные препараты, повторно запаянные в пробирку эритроциты, содержащие активный ингредиент, и иммунологические препараты.

Фармацевтическая композиция согласно изобретению может быть получена, упакована или приготовлена для продажи оптом в виде разовой унифицированной дозы или в виде множества разовых унифицированных доз. Унифицированная доза представляет собой дискретное количество фармацевтической композиции, содержащей предварительно определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента обычно равно дозе активного ингредиента, которая должна быть введена индивидууму, или соответствующей части такой дозы, например, половине или одной трети такой дозы.

Относительные количества активного ингредиента, фармацевтически приемлемого носителя и любых дополнительных ингредиентов в фармацевтической композиции согласно изобретению могут варьироваться в зависимости от особенностей, массы и состояния индивидуума, подвергаемого лечению, а также от способа введения композиции. Так, например, композиция может содержать от 0,1 до 100% (мас./мас.) активного ингредиента. В различных вариантах осуществления изобретения, композиция содержит по меньшей мере приблизительно 1%, по меньшей мере приблизительно 2%, по меньшей мере приблизительно 3%, по меньшей мере приблизительно 4%, по меньшей мере приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 6%, по меньшей мере приблизительно 7%, по меньшей мере приблизительно 8%, по меньшей мере приблизительно 9%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 11%, по меньшей мере приблизительно 12%, по меньшей мере приблизительно 13%, по меньшей мере приблизительно 14%, по меньшей мере приблизительно 15%, по меньшей мере приблизительно 16%, по меньшей мере приблизительно 17%, по меньшей мере приблизительно 18%, по меньшей мере приблизительно 19%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 21%, по меньшей мере приблизительно 22%, по меньшей мере приблизительно 23%, по меньшей мере приблизительно 24%, по меньшей мере приблизительно 25%, по меньшей мере приблизительно 26%, по меньшей мере приблизительно 27%, по меньшей мере приблизительно 28%, по меньшей мере приблизительно 29%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 31%, по меньшей мере приблизительно 32%, по меньшей мере приблизительно 33%, по меньшей мере приблизительно 34%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 36%, по меньшей мере приблизительно 37%, по меньшей мере приблизительно 38%, по меньшей мере приблизительно 39%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 41%, по меньшей мере приблизительно 42%, по меньшей мере приблизительно 43%, по меньшей мере приблизительно 44%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере приблизительно 46%, по меньшей мере приблизительно 47%, по меньшей мере приблизительно 48%, по меньшей мере приблизительно 49%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 51%, по меньшей мере приблизительно 52%, по меньшей мере приблизительно 53%, по меньшей мере приблизительно 54%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 56%, по меньшей мере приблизительно 57%, по меньшей мере приблизительно 58%, по меньшей мере приблизительно 59%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 61%, по меньшей мере приблизительно 62%, по меньшей мере приблизительно 63%, по меньшей мере приблизительно 64%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 66%, по меньшей мере приблизительно 67%, по меньшей мере приблизительно 68%, по меньшей мере приблизительно 69%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 71%, по меньшей мере приблизительно 72%, по меньшей мере приблизительно 73%, по меньшей мере приблизительно 74%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 76%, по меньшей мере приблизительно 77%, по меньшей мере приблизительно 78%, по меньшей мере приблизительно 79%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 81%, по меньшей мере приблизительно 82%, по меньшей мере приблизительно 83%, по меньшей мере приблизительно 84%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 86%, по меньшей мере приблизительно 87%, по меньшей мере приблизительно 88%, по меньшей мере

мере приблизительно 89%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99%, или по меньшей мере приблизительно 100% (мас./мас.) активного ингредиента.

Фармацевтическая композиция согласно изобретению помимо активного ингредиента может также содержать один или более дополнительных фармацевтически активных агентов.

Препараты фармацевтической композиции согласно изобретению с регулируемым или пролонгированным высвобождением могут быть получены с применением стандартной технологии.

Парентеральное введение фармацевтической композиции включает любой способ введения, характеризующийся физическим разрушением ткани индивидуума, и введения фармацевтической композиции посредством разрушения ткани. Парентеральное введение может быть местным, регионарным или системным. Таким образом, парентеральное введение включает, но не ограничивается ими, введение фармацевтической композиции путем инъекции композиции, путем введения композиции через хирургический разрез, путем введения композиции через нехирургическую рану для доставки лекарственного препарата в ткань и т.п. В частности, рассматривается парентеральное введение, которое включает, но не ограничивается ими, внутривенную, внутриглазную, интравитреальную, подкожную, внутрибрюшинную, внутримышечную, интрадермальную, интратеральную инъекцию и введение вовнутрь опухоли.

Состав фармацевтической композиции, подходящей для парентерального введения, включает активный ингредиент в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, таким как стерильная вода или стерильный изотонический физиологический раствор. Такие препараты могут быть приготовлены, упакованы или проданы в форме, подходящей для введения ударной дозы или для непрерывного введения. Инъекционные препараты могут быть приготовлены, упакованы или проданы в виде унифицированной лекарственной формы, например в ампулах или в контейнерах для многократного введения, содержащих консервант. Препараты для парентерального введения включают, но не ограничиваются ими, суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных носителях, пасты и имплантируемые препараты пролонгированного высвобождения или биоразлагаемые препараты. Такие препараты могут также содержать один или более дополнительных ингредиентов, включая, но не ограничиваясь ими, суспендирующие, стабилизирующие или диспергирующие агенты. В одном из вариантов препарата для парентерального введения, активный ингредиент содержится в сухой форме (то есть, в виде порошка или гранул) для разведения подходящим носителем (например, стерильной апиrogenной водой) перед парентеральным введением разведенной композиции.

Фармацевтические композиции могут быть приготовлены, упакованы или проданы в виде стерильной водной или масляной суспензии или раствора для инъекций. Эта суспензия или раствор могут быть приготовлены известными методами и могут включать, помимо активного ингредиента, дополнительные ингредиенты, такие как диспергирующие агенты, смачивающие агенты или суспендирующие агенты. Такие стерильные препараты для инъекций могут быть получены с использованием нетоксичного парентерально приемлемого разбавителя или растворителя, такого как, например, вода или 1,3-бутандиол. Другими приемлемыми разбавителями и растворителями являются, но не ограничиваются ими, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия и жирные масла, такие как синтетические моно- или диглицериды. Другими парентерально вводимыми препаратами, которые могут быть использованы, являются препараты, содержащие активный ингредиент в микрокристаллической форме, в форме липосомного препарата или в качестве компонента биоразлагаемых полимерных систем. Композиции для пролонгированного высвобождения или имплантации могут содержать фармацевтически приемлемые полимерные или гидрофобные вещества, такие как эмульсия, ионообменная смола, слаборастворимый полимер или слаборастворимая соль.

Фармацевтическая композиция согласно изобретению может быть приготовлена, упакована или продана в виде препарата, подходящего для введения в легкие через ротовую полость. Такой препарат может включать сухие частицы, которые содержат активный ингредиент, и которые имеют диаметр в пределах приблизительно от 0,5 до приблизительно 7 нм, а в некоторых вариантах осуществления изобретения, приблизительно от 1 до приблизительно 6 нанометров. Такие композиции обычно готовят в форме сухих порошков для введения с использованием устройства, содержащего резервуар для сухих порошков, в который может быть направлен поток пропеллента для диспергирования порошка, или с использованием контейнера для диспергирования самораспыляющегося растворителя/порошка, такого как устройство, содержащее активный ингредиент, растворенный или суспендированный в пропелленте с низкой температурой кипения в герметично закрытом контейнере. В некоторых вариантах осуществления изобретения такие порошки содержат частицы, где по меньшей мере 98% частиц по массе имеют диаметр более, чем 0,5 нм, и по меньшей мере 95% от всего количества частиц имеют диаметр менее, чем 7 нм. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 95% частиц по массе имеют диаметр более, чем 1 нм, и по меньшей мере 90% от всего количества частиц имеют диаметр менее, чем 6 нм. В некоторых вариантах осуществления изобретения сухие порошковые композиции включают твердый тонкодисперсный порошковый разбавитель, такой как сахар, и их обычно при-

готовливают в виде унифицированной лекарственной формы.

Пропелленты с низкой температурой кипения обычно включают жидкие пропелленты, имеющие точку кипения ниже 65°F при атмосферном давлении. Как правило, пропеллент может составлять от 50 до 99,9% (масс./масс.) композиции, а активный ингредиент может составлять от 0,1 до 20% (мас./мас.) композиции. Пропеллент может также включать дополнительные ингредиенты, такие как жидкое неионное или твердое анионное поверхностно-активное вещество или твердый разбавитель (в некоторых вариантах осуществления изобретения, имеющий частицы такого же размера, как и частицы, содержащие активный ингредиент).

Фармацевтические композиции согласно изобретению приготовленные для доставки в легкие, могут также содержать активный ингредиент в форме капелек раствора или суспензии. Такие композиции могут быть приготовлены, упакованы или проданы в виде водных или разведенных спиртовых растворов или суспензий, необязательно стерильных и содержащих активный ингредиент, и такие препараты обычно вводят с помощью любого устройства для распыления или тонкодисперсного распыления. Такие препараты могут также содержать один или более дополнительных ингредиентов, включая, но не ограничиваясь ими, ароматизатор, такой как натрийсодержащий сахарин, летучее масло, буферный агент, поверхностно-активное вещество или консервант, такой как метилгидроксibenзоат. В некоторых вариантах осуществления изобретения капельки, доставляемые таким способом введения, имеют средний диаметр в пределах приблизительно от 0,1 до приблизительно 200 нм.

Препараты могут быть также использованы для интраназальной доставки фармацевтической композиции согласно изобретению.

Другим препаратом, подходящим для интраназального введения, является крупнозернистый порошок, содержащий активный ингредиент и имеющий средний размер частиц приблизительно от 0,2 до 500 мкм. Такой препарат вводят так, чтобы лекарственный порошок для вдыхания через нос доставлялся посредством быстрой ингаляции через носовой проход из контейнера с порошком, подносимым близко к ноздрям.

Препараты, подходящие для интраназального введения, могут, например, содержать приблизительно по меньшей мере 0,1% (мас./мас.) и максимум 100% (мас./мас.) активного ингредиента, и могут также содержать один или более дополнительных ингредиентов.

Фармацевтическая композиция согласно изобретению может быть приготовлена, упакована или продана в виде препарата, подходящего для трансбуккального введения. Такие препараты могут, например, быть приготовлены в форме таблеток или пастилок, изготовленных обычными методами, и могут, например, содержать от 0,1 до 20% (мас./мас.) активного ингредиента, а остальная часть композиции содержит растворимые или разлагаемые ингредиенты для перорального введения и, необязательно, один или более дополнительных ингредиентов. Альтернативно, препараты, подходящие для трансбуккального введения, могут содержать порошок или аэрозольный или тонкодисперсный раствор или суспензию, содержащие активный ингредиент. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такие порошковые, аэрозольные или тонкодисперсные препараты, при распылении, имеют средний размер частиц или капелек в пределах приблизительно от 0,1 до приблизительно 200 нм, и могут также содержать один или более дополнительных ингредиентов.

Используемые в настоящем документе "дополнительные ингредиенты" включают, но не ограничиваются ими, один или более из следующих ингредиентов: наполнители; поверхностно-активные вещества; диспергирующие агенты; инертные разбавители; гранулирующие и дезинтегрирующие агенты; связывающие агенты; замасливатели; подсластители; ароматизаторы; красители; консерванты; физиологически разлагаемые композиции, такие как желатин; водные носители и растворители; масляные носители и растворители; суспендирующие агенты; диспергирующие или смачивающие агенты; эмульгаторы, смягчители; буферы; соли; загустители; наполнители; эмульгирующие агенты; антиоксиданты; антибиотики; противогрибковые средства; стабилизирующие агенты и фармацевтически приемлемые полимерные или гидрофобные вещества. Другие "дополнительные ингредиенты", которые могут быть включены в фармацевтические композиции согласно изобретению, известны специалистам в данной области и описаны, например, в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences (1985, Genaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA), которое вводится в настоящее изобретение посредством ссылки.

Клетки, продуцирующие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение включает клетку или клеточную линию (например, клетки-хозяева), которые продуцируют по меньшей мере одно из описанных в настоящем документе анти-C5-антител или их антигенсвязывающих фрагментов. В одном варианте осуществления изобретения клетка или клеточная линия представляет собой генетически модифицированную клетку, которая продуцирует по меньшей мере одно из описанных в настоящем документе анти-C5-антител или их антигенсвязывающих фрагментов. В одном варианте осуществления изобретения клетка или клеточная линия представляет собой гибридому, которая продуцирует по меньшей мере одно из описанных в настоящем документе анти-C5-антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

Гибридные клетки (гибридомы) обычно получают из массы слитых мышинных спленоцитов, которые в высокой степени обогащены В-лимфоцитами, и миеломных "клеток-партнеров по слиянию" (AI-

berts et al., *Molecular Biology of the Cell* (Garland Publishing, Inc. 1994); Harlow et al., *Antibodies. A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1988). Затем слитые клетки распределяют в пулы, которые могут быть проанализированы на продуцирование антител с нужной специфичностью. Пулы, которые давали позитивный результат в тесте, могут затем дополнительно подразделяться до тех пор, пока не будут идентифицированы моноклеточные клоны, продуцирующие антитела с нужной специфичностью. Антитела, продуцируемые такими клонами, называются моноклональными антителами.

Настоящее изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим любые описанные в настоящем документе антитела или фрагменты антител, а также к векторам, содержащим нуклеиновые кислоты. Таким образом, антитела и фрагменты согласно изобретению могут быть получены посредством экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке или в клеточной линии, такой как клеточные линии, обычно используемые для экспрессии рекомбинантных или гуманизированных иммуноглобулинов. Таким образом, антитела и их фрагменты согласно изобретению могут быть также получены путем клонирования нуклеиновых кислот в одном или более экспрессионных векторах и переноса этого вектора в клеточную линию, такую как клеточные линии, обычно используемые для экспрессии рекомбинантных или гуманизированных иммуноглобулинов.

Гены, кодирующие тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов или их фрагментов, могут быть сконструированы способами, включая, но не ограничиваясь ими, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), известную специалистам (см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Berger & Kimmel, *Methods in Enzymology*, Vol. 152: *Guide to Molecular Cloning Techniques*, Academic Press, Inc., San Diego, Calif., 1987; Co et al., 1992, *J. Immunol.* 148:1149). Так, например, гены, кодирующие тяжелые и легкие цепи, или их фрагменты, могут быть клонированы из геномной ДНК клетки, секретирующей антитело, либо кДНК получают посредством обратной транскрипции РНК клетки. Клонирование осуществляют стандартными методами, включающими использование ПЦР-праймеров, которые гибридизуются с последовательностями, фланкирующими или перекрывающими гены или сегменты клонируемых генов.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело согласно изобретению или его тяжелую цепь или легкую цепь или фрагменты, могут быть получены и использованы в соответствии с методами рекомбинантных нуклеиновых кислот для продуцирования специфического иммуноглобулина, цепи иммуноглобулина или его фрагмента или варианта в различных клетках-хозяевах или в системе трансляции *in vitro*. Так, например, антитело-кодирующие нуклеиновые кислоты или их фрагменты могут быть помещены в подходящие прокариотические или эукариотические векторы, например, экспрессионные векторы, и введены в подходящую клетку-хозяина соответствующим методом, например, путем трансформации, трансфекции, электропорации и инфицирования так, чтобы нуклеиновая кислота была функционально присоединена к одному или более элементам регуляции экспрессии, например, в векторе, или была интегрирована в геном клетки-хозяина.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения тяжелые и легкие цепи или их фрагменты могут быть собраны в двух различных экспрессионных векторах, которые могут быть использованы для совместного переноса в клетку-реципиента. В некоторых вариантах осуществления изобретения, каждый вектор может содержать два или более селективных генов, один для отбора в бактериальной системе и один для отбора в эукариотической системе. Эти векторы позволяют продуцировать и амплифицировать гены в бактериальной системе с последующей котрансфекцией в эукариотические клетки и отбором котрансфицированных клеток. Процедура отбора может быть применена для отбора на экспрессию антитело-кодирующих нуклеиновых кислот, введенных в два различных ДНК-вектора в эукариотической клетке.

Альтернативно, нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи или их фрагменты, могут быть экспрессированы из одного вектора. Хотя легкие и тяжелые цепи кодируются отдельными генами, однако, они могут быть присоединены рекомбинантными методами. Так, например, два полипептида могут быть соединены посредством синтетического линкера, который позволяет получить одну белковую цепь, где пара областей V_L и V_H образует одновалентные молекулы (известные как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al., 1988, *Science* 242: 423-426; и Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883).

Настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь и/или легкую цепь, а также их фрагменты. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательности, кодирующие легкую и тяжелую цепи или их фрагменты, может быть сконструирована так, чтобы она содержала синтетическую сигнальную последовательность для секреции антитела или его фрагмента, если она продуцируется в клетке. Кроме того, молекула нуклеиновой кислоты может содержать специфические ДНК-связи, которые позволяют встраивать другие последовательности антител и сохранять трансляционную рамку считывания так, чтобы аминокислоты, обычно присутствующие в последовательностях антител, не изменялись.

В соответствии с настоящим изобретением антитело-кодирующие последовательности нуклеиновой кислоты могут быть встроены в соответствующий экспрессионный вектор. В различных вариантах осу-

ществления изобретения, экспрессионный вектор содержит элементы, необходимые для транскрипции и трансляции встроенной антитело-кодирующей нуклеиновой кислоты с получением рекомбинантных молекул ДНК, которые направляют экспрессию последовательностей антител для образования антитела или его фрагмента.

Антитело-кодирующие нуклеиновые кислоты или их фрагменты могут быть получены различными методами рекомбинантных нуклеиновых кислот, известными специалистам в данной области, такими как сайт-направленный мутагенез.

Для экспрессии нуклеиновых кислот в клетке могут быть применены различные методы. Нуклеиновые кислоты могут быть клонированы в векторы различных типов. Однако настоящее изобретение не должно ограничиваться каким-либо конкретным вектором. Наоборот, настоящее изобретение должно охватывать векторы широкого спектра, которые являются легко доступными и/или известными специалистам. Так, например, нуклеиновая кислота согласно изобретению может быть клонирована в вектор, включая, но не ограничиваясь ими, плазмиду, фагмиду, производное фага, вирус животного и космиду. Конкретными представляющими интерес векторами являются экспрессионные векторы, векторы для репликации, векторы для образования зонда и секвенирующие векторы.

В конкретных вариантах осуществления изобретения, экспрессионный вектор выбран из группы, состоящей из вирусного вектора, бактериального вектора и вектора клеток млекопитающих. Существует множество систем экспрессионных векторов, которые включают по меньшей мере часть композиций или все композиции, обсуждаемые выше. Системы на основе прокариотического и/или эукариотического вектора могут быть использованы для их применения в настоящем изобретении в целях получения полинуклеотидов или их когнатных полипептидов. Многие такие системы являются коммерчески доступными и широко применяются.

Технология с использованием вирусных векторов хорошо известна специалистам и описана, например, Sambrook et al. (2012) и in Ausubel et al. (1999), а также в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусами, которые могут быть использованы в качестве векторов, являются, но не ограничиваются ими, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, для экспрессии нужной нуклеиновой кислоты используется вектор на основе вируса мышинных стволовых клеток (MSCV). MSCV-векторы продемонстрировали эффективную экспрессию нужных нуклеиновых кислот в клетках. Однако, настоящее изобретение не должно ограничиваться использованием только MSCV-вектора, и настоящее изобретение может включать любой метод экспрессии ретровирусов. Другими примерами вирусных векторов являются векторы на основе вируса мышинного лейкоза Молони (MoMuLV) и ВИЧ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, подходящий вектор содержит ориджин репликации, который является функциональным по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, стандартные сайты рестрикции эндонуклеазой и один или более селективных маркеров. (См., например, WO 01/96584, WO 01/29058 и патент США № 6326193).

Дополнительные регуляторные элементы, например, энхансеры, могут быть использованы для модуляции частоты инициации транскрипции. Промотором может быть промотор, обычно ассоциированный с последовательностью гена или нуклеиновой кислоты, которая может быть получена путем выделения 5'-некодирующих последовательностей, расположенных выше кодирующего сегмента и/или экзона. Такой промотор может называться "эндогенным". Аналогичным образом, энхансером может быть энхансер, обычно ассоциированный с последовательностью нуклеиновой кислоты и расположенный либо ниже, либо выше этой последовательности. Альтернативно, некоторые преимущества могут быть достигнуты путем помещения кодирующего сегмента нуклеиновой кислоты под контроль рекомбинантного или гетерологичного промотора, который представляет собой промотор, обычно не ассоциированный с последовательностью нуклеиновой кислоты в ее природном окружении. Рекомбинантный или гетерологичный энхансер также представляет собой энхансер, обычно не ассоциированный с последовательностью нуклеиновой кислоты в ее природном окружении. Такие промоторы или энхансеры могут включать промоторы или энхансеры других генов и промоторы или энхансеры, выделенные из любых других прокариотических клеток, вирус-содержащих клеток или эукариотических клеток, и промоторы или энхансеры, "не присутствующие в природе", например, содержащие различные элементы различных областей регуляции транскрипции, и/или мутации, которые изменяют экспрессию. Помимо синтеза последовательностей промоторов и энхансеров нуклеиновой кислоты, последовательности могут быть получены методами рекомбинантного клонирования и/или амплификации нуклеиновой кислоты, включая ПЦР, в комбинации с описанными в настоящем документе композициями (патент США. No. 4683202, патент США. No. 5928906). Кроме того, могут быть также использованы регуляторные последовательности, которые направляют транскрипцию и/или экспрессию последовательностей в неядерные органеллы, такие как митохондрии, хлоропласты и т.п.

Обычно необходимо использовать промотор и/или энхансер, который эффективно направляет экспрессию сегмента ДНК в клетках различных типов, в органеллах и в организме, выбранном для экспрессии. Специалистам в области молекулярной биологии обычно известно каким образом можно использовать промоторы, энхансеры и комбинации клеток различных типов для экспрессии белка, см., например,

Sambrook et al., (2012). Используемые промоторы могут быть конститутивными, тканеспецифическими, индуцибельными и/или подходящими, в соответствующих условиях, для направления экспрессии введенного ДНК-фрагмента на высоком уровне, что является преимуществом при проведении крупномасштабного продуцирования рекомбинантных белков и их фрагментов.

Примером промотора является последовательность промотора предраннего цитомегаловируса (CMV). Эта последовательность промотора представляет собой в высокой степени конститутивную последовательность промотора, способную инициировать экспрессию любой полинуклеотидной последовательности, функционально присоединенной к этой последовательности, на высоком уровне. Однако, могут быть также использованы и другие конститутивные промоторные последовательности, включая, но не ограничиваясь ими, ранний промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), промотор вируса мышинной опухоли молочной железы (MMTV), промотор длинных концевых повторов (LTR) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор вируса Молони, промотор вируса птичьего лейкоза, предранний промотор вируса Эпштейна-Барра, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы человеческих генов, такие как, но не ограничивающиеся ими, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор мышечного креатина. Кроме того, настоящее изобретение не должно ограничиваться применением конститутивных промоторов. В настоящее изобретение также входят и индуцибельные промоторы. Применение индуцибельных промоторов в настоящем изобретении позволяют осуществлять переключение молекулы на экспрессию полинуклеотидной последовательности, функционально присоединенной к этой молекуле, если такая экспрессия необходима, или выключение экспрессии, если она не является необходимой. Примерами индуцибельных промоторов являются, но не ограничиваются ими, промотор металлотионеина, промотор глюкокортикоида, промотор прогестерона и промотор тетрациклина. Кроме того, изобретение включает применение тканеспецифического промотора или промотора, специфичного к клеткам конкретного типа, и такой промотор представляет собой промотор, который является активным только в нужной ткани или клетке. Тканеспецифические промоторы хорошо известны специалистам в данной области и включают, но не ограничиваются ими, промотор HER-2 и промоторные последовательности, ассоциированные с PSA.

Для оценки экспрессии нуклеиновых кислот, экспрессионный вектор, вводимый в клетку, может также содержать селективный маркерный ген или репортерный ген или оба этих гена для облегчения идентификации и отбора экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые, предположительно, были трансфицированы или инфицированы вирусными векторами. В других вариантах осуществления изобретения, селективный маркер может присутствовать на отдельной нуклеиновой кислоте и может использоваться в процедуре котрансфекции. Селективные маркерные гены и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии в клетках-хозяевах. Используемые селективные маркеры известны специалистам в данной области и включают, например, гены резистентности к антибиотикам, такие как пео и т.п.

Репортерные гены используются для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. Репортерные гены, которые кодируют легко анализируемые белки, хорошо известны специалистам в данной области. Вообще говоря, репортерным геном является ген, который не присутствует в организме или в ткани реципиента или не экспрессируется в них, и кодирует белок, экспрессия которого идентифицируется по некоторым легко детектируемым свойствам, например, по ферментативной активности. Экспрессию репортерного гена анализируют в подходящее время после введения ДНК в клетки реципиента.

Подходящими репортерными генами могут быть гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, секретрируемую щелочную фосфатазу или белок, флуоресцирующий в зеленом диапазоне спектра (см., например, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Lett 479: 79-82). Подходящие экспрессионные системы хорошо известны и могут быть получены хорошо известными методами, либо они могут быть закуплены. Вообще говоря, конструкция с минимальной 5'-фланкирующей областью, показывающая наивысший уровень экспрессии репортерного гена, была идентифицирована как промотор. Такие промоторные области могут быть присоединены к репортерному гену и использованы для оценки агентов на способность модулировать транскрипцию, индуцированную промотором.

Методы введения нуклеиновых кислот в клетку и их экспрессии в клетке известны специалистам. Что касается экспрессионного вектора, то такой вектор может быть легко введен в клетку-хозяина, например, в клетку млекопитающего, бактерии, дрожжей или насекомого любым известным методом. Так, например, экспрессионный вектор может быть перенесен в клетку-хозяина физическими, химическими или биологическими методами.

Физические методы введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают преципитацию фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию, лазерное облучение и т.п. Методы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Sambrook et al., (2012) и Ausubel et al., (1999).

Биологические методы введения представляющей интерес нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина

включают использование ДНК-и РНК-векторов. Вирусные векторы, а в частности, ретровирусные векторы стали наиболее широко использоваться в методах встраивания генов в клетки млекопитающего, например, человека. Другие вирусные векторы могут происходить от лентивирусов, поксвирусов, вируса простого герпеса 1, аденовирусов и адено-ассоциированных вирусов и т.п. См., например, патенты США №№ 5350674 и 5585362.

Химические средства для введения нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина включают использование коллоидных дисперсионных систем, таких как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, гранулы и липидные системы, включая эмульсии типа "масло в воде", мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Предпочтительной коллоидной системой для ее использования в качестве носителя для доставки *in vitro* и *in vivo* является липосома (например, искусственная мембранная везикула). Получение и применение таких систем хорошо известны специалистам в данной области.

Независимо от метода, применяемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина или какой-либо другой обработки клетки нуклеиновой кислотой согласно изобретению, для подтверждения присутствия рекомбинантной последовательности ДНК в клетке-хозяине, могут быть проведены различные анализы. Такие анализы включают, например, "молекулярно-биологические анализы", хорошо известные специалистам в данной области, такие как Саузерн- и Нозерн-блот-анализы, ОТ-ПЦР и ПЦР; "биохимические анализы", такие как детектирование присутствия или отсутствия конкретного пептида, например, иммунологическими средствами (с помощью ELISA и Вестерн-блот-анализов), или с помощью описанных в настоящем документе анализов для идентификации агентов, входящих в объем настоящего изобретения.

Наборы

Настоящее изобретение также включает набор, содержащий анти-C5 антитело или его комбинации согласно изобретению и пояснительный материал, в котором описано, например, введение анти-C5 антитела или его комбинаций индивидууму в качестве терапевтического лечения или нетерапевтического применения, как описано в настоящей заявке. В одном из вариантов осуществления изобретения, этот набор также содержит (необязательно стерильный) фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для растворения или суспендирования терапевтической композиции, содержащей анти-C5 антитело или их комбинации согласно изобретению, например, до введения индивидууму антитела. Набор содержит, но необязательно, аппликатор для введения антитела.

Экспериментальные примеры

Настоящее изобретение описано со ссылкой на нижеследующие примеры. Эти примеры приводятся лишь в иллюстративных целях, и настоящее изобретение никоим образом не ограничивается этими примерами, и в него также могут быть включены любые и все варианты, которые будут очевидны для специалиста исходя из приведенного в настоящем документе описания.

Без дополнительного описания специалист в данной области может на основе предшествующего описания и нижеследующих иллюстративных примеров получить и использовать соединения согласно изобретению и осуществить заявленные способы на практике. Нижеследующие примеры представляют собой рабочие примеры, а поэтому их никоим образом не следует рассматривать как ограничение объема остальной части раскрытия изобретения.

Пример 1.

Система комплемента является частью врожденного иммунитета, который играет ключевую роль в защите хозяина. Тем не менее, активированный комплемент может также вызывать значительное повреждение и деструкцию тканей, и было обнаружено, что нарушение регуляции активности комплемента ассоциируется с развитием ряда редких и распространенных заболеваний, таких как пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), атипичский гемолитический уремический синдром, ревматоидный артрит, возрастная дегенерация желтого пятна и т.п. Таким образом, терапия антителами против комплемента представляет собой перспективный способ лечения этих расстройств у человека.

Комплемент C5 представляет собой белок, играющий ключевую роль в терминальном пути активации комплемента, и является белком-предшественником для образования сильного провоспалительного медиатора C5a, а также цитолитического мембрано-атакующего комплекса (MAC).

Было получено и охарактеризовано шесть (6) мышинных моноклональных антител против человеческого C5, и было подтверждено, что эти антитела представляют собой mAb против C5 человека, блокирующие функцию, то есть, блокирующие образование C5a и MAC, если комплемент активируется по классическому, лектиновому или альтернативному пути. Эти mAb имеют следующие обозначения: mAb 4E7, 9G6, 11C5, 2G1, 11D9 и 8E1.

Кроме того, были определены подтипы тяжелых и легких цепей вышеупомянутых антител Ig, и были клонированы кДНК вариabельных областей тяжелых цепей 6 mAb.

Методы и материалы, применяемые в этом примере, описаны ниже.

Анализ на аффинность анти-C5 mAb.

Был проведен анализ методом поверхностного плазмонного резонанса в целях измерения константы скорости ассоциации и диссоциации для связывания C5 человека с анти-C5 mAb с использованием устройства Biacore 3000 (Biacore AB, Uppsala, Sweden), и все эксперименты Biacore были проведены при

25°C. Карбоксилированная декстрановая матрица сенсорного чипа CM5 была использована для связывания очищенного кроличьего mAb против α -цепи мышинового IgG (RAMFc) химическим методом присоединения амина до достижения поверхностной плотности 1000 RU, и анти-C5 mAb захватывали на иммобилизованных RAMFc. После стабилизации связывания с анти-C5 mAb, на поверхность чипа в HBSET (в буфере HEPES, содержащем физиологический раствор вместе с EDTA и Твином 20) впрыскивали различные концентрации C5 человека в пределах 100, 50, 25, 12,5, 6,25 и 0 нМ, и образцы впрыскивали на поверхность антитела со скоростью 30 мкл/мин (60 мкл-инъекция) в течение 180 секунд, а затем осуществляли диссоциацию связанного анализита в течение 900 с. Данные были проанализированы с помощью компьютерной программы для оценки BIA 3.2 на модели связывания 1:1. Регенерация поверхности была достигнута путем впрыскивания 50 мкл (50 мкл/мин) 10 мМ Гликона-HCl при pH 1,5.

Анализ на LPS-индуцированное продуцирование C5a.

Нормальную 10% человеческую сыворотку (NHS) предварительно инкубировали с различными концентрациями 4E7, 9G6, 11C5, 2G1, 11D9 и 8E1 при 4°C в течение 1 ч. Образцы, обработанные антителом, инкубировали с LPS в Mg-EGTA GVB2+ при 37°C в течение 1 ч, а затем реакцию завершали путем добавления 40 мМ EDTA в PBS.

"Сэндвич"-ELISA для детектирования C5 человека: 96-луночные планшеты покрывали мышинным антителом против C5 человека (R&D systems # MAB2037) в конечной концентрации 1 мкг/мл при 4°C в течение ночи. После трех промывок PBS, содержащим 0,05% Твин-20, планшеты инкубировали с пробой сыворотки, разведенными 1/8 (из анализа на LPS-индуцированное продуцирование C5a) при комнатной температуре в течение 1 ч. После другой промывки, планшеты инкубировали с соответствующим биотинилированным mAb против C5 человека (R&D systems # BAF20371) при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем снова промывали и инкубировали со стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (BD pharmagen # 554058) при комнатной температуре в течение 1 ч. После последней промывки, планшет проявляли субстратом для ПХ в течение 6-10 мин. Реакцию завершали добавлением 2н. H₂SO₄, и планшет считывали на 450 нм в микропланшет-ридере.

Анализ на связывание C5 человека и mAb.

Полистироловые микротитрационные планшеты покрывали очищенным человеческим C5 (50 нг/лунку) в PBS при 37°C в течение 1 ч. После аспирации раствора C5, лунки блокировали PBS, содержащим 1% BSA в PBS при комнатной температуре в течение 1 ч. Лунки без покрытия C5 служили в качестве фонового контроля. Затем в лунки добавляли различные концентрации 4E7, 9G6, 11C5, 2G1, 11D9 и 8E1, 50 мкл/лунку в блокирующем растворе. После инкубирования в течение 1 ч при комнатной температуре, лунки тщательно промывали PBST. mAb, связанное с C5 человека, детектировали путем добавления ПХ-конъюгированного антитела против мышинового IgG или ПХ-конъюгированного антитела против человеческого IgG4 HRP при разведении 1:4000 в блокирующем растворе, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки PBST, планшет проявляли субстратом для ПХ в течение 6-10 мин. Реакцию завершали добавлением 2н. H₂SO₄, и планшет считывали на 450 нм в микропланшет-ридере.

Получение mAb против C5 человека.

Самок мышей B10.D2/oSnJ (Stock # 000461, Jackson laboratory) иммунизировали 30 мкг очищенного C5 человека (# A120, Complement Technology Inc), эмульгированного в адьюванте. На день 14, мышей снова иммунизировали 30 мкг очищенного C5 человека, эмульгированного в адьюванте. До слияния, мышам три раза вводили бустер-инъекцию 33 мкг очищенного C5 человека. Затем мышей умерщвляли путем смещения шейных позвонков, и селезенку выделяли путем механической дизрупции для получения моноклеточной суспензии. Суспензию клеток селезенки один раз промывали средой HYB-SFM (Invitrogen) + 10% FBS, и клетки подсчитывали, а затем смешивали с миеломными клетками X63-Ag8.653 (ATCC) в отношении 2:1. Клеточную смесь снова промывали средой HYB-SFM, и клеточный осадок получали путем центрифугирования (1000 об/мин \times 5 мин). Клеточный осадок осторожно разрушали и разрыхляли, а затем индуцировали слияние клеток путем медленного добавления полиэтиленгликоля (ПЭГ 1500) (1,5 мл ПЭГ для 3×10^8 клеток). Клетки оставляли на 1 мин при 37°C, а затем к клеткам добавляли 20 мл среды HYB-SFM в течение 3 мин (1 мл в течение первой минуты, 3 мл в течение второй минуты, и 16 мл в течение третьей минуты). Смесь центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин, и клетки высевали в 24-луночные планшеты в среде NAT (10 мл NAT [Sigma H0262], 5 мл пенициллина/стрептомицина, 500 мкл гентамицина и 10% FBS в 500 мл среды HYB-SFM). Через 2 недели, супернатанты лунок с визуально наблюдаемыми колониями брали для ELISA-скрининга на способность реагировать с очищенным человеческим C5. Позитивные клоны собирали и высевали в 96-луночные планшеты методом лимитирующего разведения с получением одиночных клонов после второго раунда скрининга с помощью ELISA. Позитивные клоны размножали в NT-среде (10 мл NT, 5 мл пенициллина/стрептомицина, 500 мкл гентамицина и 10% FBS в 500 мл среды HYB-SFM). Перед сбором антител, гибридомные клетки переносили в бессывороточную среду (HYB-SFM) на 2-3 дня. Клеточную культуральную среду собирали для очистки mAb с помощью аффинной хроматографии на G-белке.

Клонирование mAb.

Для клонирования кДНК 4E7, 9G6, 11C5, 2G1, 11D9 и 8E1, все РНК выделяли из гибридомных клеток с использованием реагента TRizol (Sigma). кДНК первой цепи синтезировали посредством обратной транскрипции с использованием олиго(dT)-праймера. Для амплификации кДНК тяжелой цепи (для IgG1, IgG2a/b), в ПЦР использовали следующие праймеры: 5'-GAGGTGAAGCTGGTGGAG(T/A)C(T/A)GG-3' (SEQ ID NO:77) и 5'GGGGCCAGTGGATAGAC-3' (SEQ ID NO:78). Для амплификации легкой цепи к использовали следующие праймеры: смесь из 4 вышерасположенных праймеров: 5'-CCAGTTCCGAGTCCAGATGACCCAGACTCCA-3' (SEQ ID NO:79); 5'-CCAGTTCCGAGCTCGTGCTCACCCAGTCTCCA-3' (SEQ ID NO:80); 5'-CCAGTTCCGAGCTCCAGATGACCCAGTCTCCA-3' (SEQ ID NO:81); 5'-CCAGTTCCGAGCTCGTGATGACACAGTCTCCA-3' (SEQ ID NO: 82); и нижерасположенного праймера: 5'-GTTGGTGCAGCATCAGC-3' (SEQ ID NO:83). ПЦР-ампликоны клонировали в вектор pCR TOPO TA 2.1 (Invitrogen) и секвенировали. Для получения сигнальной пептидной (лидерной) последовательности mAb был применен метод 5'-RACE с использованием набора (GeneRacer) от Invitrogen. Полноразмерные кДНК варибельной области амплифицировали с использованием специфических праймеров, определенных по данным 5'-RACE и данным исходного секвенирования.

Конструирование и экспрессия химерного mAb 2G1 кДНК тяжелой цепи химерного 2G1 конструировали путем клонирования варибельной области mAb 2G1 в вектор pFUSE-CHIg-hG4 (от InvivoGen, содержащий константную область тяжелой цепи человеческого IgG4 с заменой серина 229 на пролин (SEQ ID NO:60) с использованием EcoRI/NheI-сайтов. кДНК легкой цепи химерного 2G1 конструировали путем клонирования варибельной области mAb 2G1 в вектор pFUSE2-CLIg-hk (от InvivoGen, содержащий константную область человеческой легкой цепи k (SEQ ID NO: 61)) с использованием AgeI/BsiWI-сайтов. Клетки CHO котрансфецировали тяжелой и легкой цепями химерного 2G1 или тяжелой и легкой цепями гуманизированного 2G1 (две гуманизированных тяжелых цепи были спарены с той же самой гуманизированной легкой цепью) с использованием реагента липофектамина. После трансфекции, клетки CHO отбирали с использованием геоцина (1 мг/мл) и бластицидина (10 мкг/мл) приблизительно в течение 7 дней. Клеточные колонии, резистентные к лекарственному средству, собирали, трипсинизировали и подвергали лимитирующему разведению в культуре в 96-луночных планшетах в присутствии тех же самых лекарственных средств для отбора. После того, как клетки становились конфлюэнтными в 96-луночных планшетах, среду тестировали на способность реагировать с C5 человека с помощью ELISA, и позитивные клоны размножали. Для продуцирования антитела, стабильные линии трансфецированных клеток CHO культивировали в среде DMEM:F12 с 10% FBS в 150 см-колбах для культивирования, и после достижения конфлюэнтности, их переносили в бессывороточную среду CD-CHO (Invitrogen). Через 3 дня, среду собирали, и Ab очищали с помощью хроматографии на G-белке. Аликвоты очищенных Ab анализировали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ.

Конструирование и экспрессия гуманизированного mAb 2G1 CDR VH и VL mAb 2G1 присоединяли к каркасным областям сегментов гена варибельной области зародышевой линии и сегментов гена стыка (V, J) тяжелой и легкой цепей человеческого Ig, соответственно, после чего был проведен отбор исходя из сходства CDR человеческих иммуноглобулинов и mAb 2G1 (Hwang et al, Method, 2005). Преимущество этого подхода заключается в возможности получения гуманизированных Ab, которые сохраняют аффинность связывания с когнатным антигеном и значительно снижают потенциальную иммуногенность не-человеческих Ab, поскольку все остатки в каркасных областях происходят от последовательностей человеческих Ab зародышевой линии. кДНК тяжелой цепи гуманизированного 2G1 конструировали путем клонирования варибельной области гуманизированной тяжелой цепи 2G1 (синтезированной Genescript) в вектор pFUSE-CHIg-hG4 (от InvivoGen, содержащий константную область тяжелой цепи человеческого IgG4 с заменой серина 229 на пролин (SEQ ID NO:60)) с использованием EcoRI/NheI-сайтов. кДНК легкой цепи гуманизированного 2G1 конструировали путем клонирования варибельной области гуманизированной легкой цепи 2G1 (синтезированной Genescript) в вектор pFUSE2-CLIg-hk (от InvivoGen, содержащий константную область человеческой легкой цепи k (SEQ ID NO: 61)) с использованием AgeI/BsiWI-сайтов. Клетки CHO котрансфецировали тяжелой и легкой цепями химерного 2G1 или тяжелой и легкой цепями гуманизированного 2G1 (две гуманизированных тяжелых цепи были спарены с той же самой гуманизированной легкой цепью) с использованием реагента липофектамина. После трансфекции, клетки CHO отбирали с использованием геоцина (1 мг/мл) и бластицидина (10 мкг/мл) приблизительно в течение 7 дней. Клеточные колонии, резистентные к лекарственному средству, собирали, трипсинизировали и подвергали лимитирующему разведению в культуре в 96-луночных планшетах в присутствии тех же самых лекарственных средств для отбора. После того, как клетки становились конфлюэнтными в 96-луночных планшетах, среду тестировали на способность реагировать с C5 человека с помощью ELISA, и позитивные клоны размножали. Для продуцирования антитела, стабильные линии трансфецированных клеток CHO культивировали в среде DMEM:F12 с 10% FBS в 150 см-колбах для культивирования, и после достижения конфлюэнтности, их переносили в бессывороточную среду CD-CHO (Invitrogen). Через 3 дня, среду собирали, и Ab очищали с помощью хроматографии на G-белке. Аликвоты очищенных Ab анализировали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ.

Анализ на гемолиз.

Анализ на лизис овечьих эритроцитов (RBC): Овечьи RBC (1×10^7 или 1×10^8 клеток; Complement Technology Inc) инкубировали при 37°C в течение 20 мин с 10% или 50% NHS (Complement Technology Inc) в буфере с желатином и вероналом (GVB2+, Sigma). Перед добавлением к овечьим RBC, NHS предварительно инкубировали с mAb (4E7, 9G6, 11C5, 2G1, 11D9, 8E1 и контрольным mAb 7A12) или с химерными 2G1 и 7A12 или гуманизированным 2G1 в течение 1 ч при 4°C . Реакцию лизиса прекращали путем добавления охлажденного льдом 40 мМ EDTA в PBS. Смеси для инкубирования центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин, и супернатант собирали и определяли $\text{OD}_{405\text{нм}}$. Образцы без NHS или с добавленным EDTA использовали в качестве негативного контроля лизиса, и образец полностью лизированных овечьих RBC с дистиллированной водой использовали в качестве позитивного контроля (100% лизис), по которому нормализовали % лизиса в других образцах.

Анализ на лизис куриных RBC.

Куриные RBC (1×10^7 или 1×10^8 клеток; Complement Technology Inc) инкубировали при 37°C в течение 1 ч с 50% сывороткой (Complement Technology Inc) в GVB2+. Перед добавлением к куриным RBC, сыворотку, взятую у животных различных видов, включая человека, собак, кроликов, хомячков, коз, свиней, овец, макак-резусов или собакоподобных обезьян, предварительно инкубировали с 50 мкг/мл 4E7, 9G6, 11C5, 2G1, 11D9 или 8E1 в течение 1 ч при 4°C . В некоторых экспериментах, NHS предварительно инкубировали с серийно разведенными 2G1 или 8E1 в течение 1 ч при 4°C . Реакцию лизиса прекращали путем добавления охлажденного льдом 40 мМ EDTA в PBS. Смеси для инкубирования центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин, и супернатант собирали и определяли $\text{OD}_{405\text{нм}}$. Собранные данные нормализовали по данным для сыворотки плюс EDTA в качестве негативного контроля (0%) и для сыворотки без антитела в качестве позитивного контроля (100%).

Анализ на лизис RBC при PNH: NHS разводили буфером GVB2+, подкисляли до pH 6,4 (подкисленная нормальная человеческая сыворотка: aNHS) и использовали для анализов на лизис RBC при PNH. 5×10^6 клеток добавляли в 50% aNHS. Затем инкубировали при 37°C , и через 30 мин, реакцию прекращали путем добавления 200 мкл холодного 20 мМ EDTA в PBS. mAb 2G1 инкубировали с aNHS в течение 30 мин при 4°C , а затем добавляли к RBC при PNH. RBC осаждали путем центрифугирования, и оптическую плотность аликвоты выделенного супернатанта на 405 нм использовали для вычисления процента лизиса. RBC при PNH, лизированные в воде, использовали в качестве 100% стандарта лизиса.

Экспрессия β -цепи C5 человека и мутантов с делецией доменов: кДНК C5 человека (hC5) в векторе pGEM-T закупили у Sino Biologicals Inc. (Cat#HG13416-G). Нуклеотидную последовательность C5, полученную от Sino Biologicals Inc., подтверждали с использованием праймеров, специфичных к гену и вектору. Нуклеотидную и белковую последовательность β -цепи hC5 идентифицировали с использованием PubMed (NM 001735.2) и Uniprot Id-P01031. β -цепь от hC5 амплифицировали и клонировали в вектор pCAGGS. Мутанты с делецией доменов макроглобулина (MG) β -цепи (MG1, MG, MG3, MG4, MG5 и MG6) получали в векторе hC5-pGEM-T посредством инверсной ПЦР, а делецию подтверждали путем секвенирования. Мутанты доменов MG β -цепи hC5 аналогичным образом клонировали в вектор pCAGGS. Праймеры, используемые для конструирования и клонирования мутантов с делециями MG, перечислены ниже в табл. 1.

Таблица 1. Праймеры, используемые для конструирования и клонирования мутантов MG

SEQ ID NO:	Праймер	Последовательность (5'-3')
90	hC5 β -MG1delReverse	TCCCCAGGTTTTCCCCAGGAAGAT
91	hC5 β -MG1delForward	AATGGATTTCTCTTCATTCATAC
92	hC5 β -MG2delReverse	GTCATAGGTTATTGGCATCTTT
93	hC5 β -MG2delForward	TTGCCACATTTTTCTGTCTCAATC
94	hC5 β -MG3delReverse	GACATATCTTTAACTTCAAAATATG
95	hC5 β -MG3delForward	CCCTACAAACTGAATTTGGTTG
96	hC5 β -MG4delReverse	AGAGAGGACATATTTGATGCCAG
97	hC5 β -MG4delForward	TCTCTCAGCCAAAGTTACCTT
98	hC5 β -MG5delReverse	TGAGTATGCTATTGCTCGGTAAC
99	hC5 β -MG5delForward	TGTGGCAACCAGCTCCAGGTTC
100	hC5 β -MG6delReverse	TTTTTCTCAATATTTAACCAG
101	hC5 β -MG6delForward	AGGCCAAGAAGAACGCTGCAAAAG
102	hC5infF	TTTTGGCAAAGAATTCGCCACCATGGG CCTTTTGGGAATAC
103	hC5 β infR	CCTGAGGAGTGAATTTAATGGTGATGG TGATGGTGGAGAATTTCTTTACAAGGTTTC

Трансфекция hC5B и hC5B с делециями MG: кДНК интактной β -цепи и различных мутантов с делециями доменов MG переносили в клетки НЕК с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen). Через 48 ч супернатанты собирали и использовали для анализа.

Электрофорез в ДСН-ПААГ и Вестерн-блот-анализ.

Для Вестерн-блот-анализа, 40 мкл супернатанта клеток НЕК, трансфецированных β -цепью hC5 и мутантом с делециями доменов MG, или супернатанта нетрансфецированных клеток НЕК (негативный контроль) добавляли в пробирки, содержащие буфер для образцов и β -меркаптоэтанол. Очищенный человеческий C5 использовали в качестве позитивного контроля. Образцы кипятили при 100°C в течение 7 мин и загружали на 4-12% градиентный гель, а затем белки переносили на PVDF-мембрану с размером пор 0,2 мкм. Мембрану блокировали 5% обезжиренным сухим молоком в TBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем, мембрану инкубировали с "первым" антителом (козьим поликлональным анти-C5 антителом от Comptech, cat#A220 или биотинилированным mAb 2G1-3 или QDC5) в 5% обезжиренном сухом молоке в TBST при 4°C в течение ночи. Мембрану промывали TBS с 0,1% Твина-20 (TBST) в течение 6×5 мин и инкубировали с кроличьим антикозьим ПХ-конъюгированным антителом при разведении 1:4000 (Bio-Rad, Cat#172-1034) в течение 1 ч при комнатной температуре. Белки детектировали с использованием субстрата для Вестерн-блот-анализа Pierce™ ECL 2 в соответствии с инструкциями производителя. mAb QDC5 представляет собой рекомбинантное mAb против человеческого IgG4, имеющее последовательности VH и VL гуманизированного мышиного mAb против C5 человека, описанного Thomas et al. (Mol Immunol., 1996 Dec;33(17-18):1389-401). Это антитело экспрессировалось в клетках Expi-CHO (Invitrogen) и было очищено с помощью аффинной хроматографии на белке А.

"Сэндвич"-ELISA для детектирования β -цепи hC5 и мутантов с делецией MG.

Для проведения "сэндвич"-ELISA, 96-луночные планшеты покрывали mAb 2G1-3 mAb в конечной концентрации 2 мкг/мл при 4°C в течение ночи. После трех промывок PBS, содержащим 0,05% Твин-20, планшеты блокировали 3% альбумином бычьей сыворотки (BSA) в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки, планшеты инкубировали 200 мкл супернатантов трансфецированных клеток НЕК или 20% NHS в течение 1 ч при комнатной температуре. После второй промывки, планшеты инкубировали с детектирующим антителом SKY59 в конечной концентрации 2 мкг/мл при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем снова промывали и инкубировали ПХ-конъюгированным "вторым" антителом, специфичным к человеческому IgG4 (Invitrogen # MA1-34437) при комнатной температуре в течение 1 ч. mAb SKY59 было определено как экспрессировалось как рекомбинантное mAb IgG4, как было определено исходя из опубликованных последовательностей VH/VL (Fukuzawa et al., Sci Rep., 2017 Apr 24; 7 (1): 1080. doi: 10.1038/s41598-017-01087-7). В случае Вестерн-блот-анализа, проводимого с использованием козьего поликлонального антитела против C5 человека, это антитело было использовано при разведении 1:500 при комнатной температуре в течение 1 ч. После дополнительной промывки, лунки инкубировали с ПХ-конъюгированным кроличьим антителом против козьих IgG (1:4000) в течение 1 ч. Планшеты проявляли субстратом для ПХ в течение 6-10 минут. Реакцию завершали добавлением 2н. H₂SO₄, и планшет считывали на 450 нм в микропланшет-ридере.

Результаты этого примера описаны ниже.

Результаты ELISA-анализа, которые продемонстрировали связывание mAb против C5 человека 4E7, 9G6, 11C5, 2G1, 11D9 и 8E1 с C5 человека, представлены на фигуре 1. Был проведен прямой ELISA-анализ на связывание с антигеном, в котором mAb были серийно разведены во всех микротитрационных планшетах, покрытых очищенным человеческим C5. Все шесть mAb показали высокий уровень реактивности с C5 человека.

Результаты экспериментов, которые продемонстрировали высокую аффинность связывания анти-C5 mAb 2G1, 8E1, 4E7, 9G6, 11C5 и 11D9 с C5, представлены на фигурах 2-7. Очищенное кроличье mAb против α -цепи мышиного IgG (RAMFc) связывали с чипом CM4 методом присоединения аминов. Затем анти-C6 mAb захватывали на иммобилизованном RAMFc. Анализы Biacore осуществляли на устройстве Biacore-2000.

Дозозависимое ингибирование LPS-индуцированного продуцирования C5a под действием mAb против C5 человека 4E7, 9G6, 11C5, 2G1, 11D9 и 8E1 проиллюстрировано на фиг. 8. Для оценки влияния mAb против C5 человека на LPS-индуцированное продуцирование C5a была использована комбинация из двух анализов: "сэндвич"-ELISA на LPS-индуцированное продуцирование C5a и на человеческий C5a. Все шесть mAb эффективно ингибировали LPS-индуцированное продуцирование C5a при добавлении к 10% нормальной человеческой сыворотке (NHS) в конечной концентрации 12,5 мкг/мл.

Влияние mAb против C5 человека 4E7, 9G6, 11C5, 2G1, 11D9 и 8E1 на комплемент-опосредуемый гемолиз показано на фиг. 9. На фиг. 9А проиллюстрирован лизис RBC, определенный путем измерения оптической плотности OD_{405нм} после инкубирования овечьих RBC с 50% NHS, содержащей серийные разведения каждого анти-C5 mAb при 37°C в течение 1 ч. Лизис RBC определяли путем измерения оптической плотности OD_{405нм}. При 120 мкг/мл, все mAb ингибировали лизис овечьих эритроцитов, опосредуемый 50% NHS. При более низких дозах (например, 30-60 мкг/мл), 9G6 менее активно предотвращало гемолиз, чем другие mAb. На фиг. 9В показано, что при 30 мкг/мл, mAb 2G1 и 8E1 более активно инги-

бирова́ли комплемент-опосредуемый гемолиз, чем 4E7, 11C5 и 11D9.

Влияние mAb против C5 человека 4E7, 9G6, 11C5, 2G1, 11D9 и 8E1 на комплемент-опосредуемый гемолиз с использованием сыворотки, взятой у животных различных видов, показано на фиг. 10. Куриные RBC инкубировали с 50% NHS, нормальной кроличьей сывороткой, сывороткой макака-резуса или сывороткой собакоподобных обезьян, содержащей каждое анти-C5 mAb (конечная концентрация 50 мкг/мл), при 37°C в течение 1 ч. Лизис RBC определяли путем измерения оптической плотности OD_{405нм} и нормализовали на сыворотку с EDTA в качестве негативного контроля (0%) и на сыворотку без антигена в качестве позитивного контроля (100%). В анализе на гемолиз с использованием NHS, пять из шести mAb против C5 человека в значительной степени ингибировали гемолиз, то есть, более, чем на 50%. В частности, образцы NHS, содержащие 2G1, почти полностью ингибировали гемолиз. При обработке mAb 9G6 или 2G1, гемолитическая активность в кроличьей сыворотке значительно снижалась. С другой стороны, ни одно mAb не ингибировало комплемент-опосредуемый гемолиз при использовании сыворотки обезьян (макака-резуса и собакоподобных обезьян), коз, свиней и овец.

Влияние mAb против C5 человека 2G1 и 8E1 на комплемент-опосредуемый гемолиз показано на фиг. 11. Куриные RBC инкубировали с 50% NHS, содержащей серийные разведения 2G1 или 8E1 или контрольного mAb (MOPC, мышинного IgG1) при 37°C в течение 1 ч. Лизис RBC определяли путем измерения оптической плотности OD_{405нм}.

Влияние mAb против C5 человека 2G1 на гемолиз RBC при PNH показано на фиг. 12. RBC, взятые у пациентов с пароксизмальной ночной гемоглобинурией (PNH), тестировали с использованием подкисленной сыворотки Хэмса в присутствии или в отсутствии mAb 2G1. RBC инкубировали с 50% NHS, содержащей серийные разведения 2G1 при 37°C в течение 1 ч. Лизис RBC определяли путем измерения оптической плотности OD_{405нм}. В отсутствие mAb, приблизительно 35% RBC подвергались лизису под действием подкисленной сыворотки, а обработка mAb 2G1 приводила к 70% снижению гемолитической активности при 25 мкг/мл и к 85% снижению при 40 мкг/мл.

Последовательности шести антител представлены на фигурах 13-18. На фиг. 13 представлены последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей mAb 2G1. На фиг. 14 представлены последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей mAb 8E1. На фиг. 15 представлены последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей mAb 4E7. На фиг. 16 представлены последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей mAb 9G6. На фиг. 17 представлены последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей mAb 11C5. На фиг. 18 представлены последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей mAb 11D9.

Аминокислотные последовательности константной области тяжелой цепи человеческого IgG4 с заменой серина 228 на пролин (то есть, S228P) и константной области человеческой легкой цепи каппа представлены на фиг. 19. Эти последовательности были использованы для конструирования химерного (мышинная варибельная область+человеческая константная область) и гуманизированного (гуманизированная мышинная варибельная область+человеческая константная область) антитела против C5 человека (2G1).

Способность химерного mAb 2G1 против человеческого IgG4 реагировать с C5 человека показана на фиг. 20. Химерное 2G1 получали путем присоединения варибельных областей mAb 2G1 к константной области тяжелой цепи человеческого IgG4, несущей мутацию S228P, и к константной области человеческой легкой цепи каппа. Планшет покрывали человеческим C5. После инкубирования с серийно разведенным химерным 2G1, связанное химерное mAb детектировали с использованием ПХ-конъюгированного антитела против человеческого IgG4. Химерное 2G1 связывалось с C5 человека в зависимости от дозы.

Влияние химерного mAb 2G1 против человеческого IgG4 на гемолиз, опосредуемый классическими путями комплемента, показано на фиг. 21. Сенсibilизированные овечьи RBC инкубировали с NHS, содержащей серийно разведенное химерное 2G1, при 37°C в течение 1 ч. Лизис RBC определяли путем измерения оптической плотности OD_{405нм}. Результаты показали, что при 30 мкг/мл и при более высоких концентрациях, химерное mAb 2G1 ингибировало лизис овечьих эритроцитов, опосредуемый 50% NHS.

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой цепи (VH) гуманизированного mAb 2G1 (гуманизированного 2G1 VH-11801) представлены на фиг. 22. Гуманизация была достигнута путем присоединения CDR VH мышинного mAb 2G1 к кодируемой человеческой VH зародышевой линии с сохранением рамки считывания (11801). Аминокислотная последовательность сигнального пептида подчеркнута, а последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 выделена жирным шрифтом и заштрихована.

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности другой гуманизированной VH mAb 2G1 (гуманизированного 2G1 VH-16901) представлены на фиг. 23. Гуманизация была достигнута путем присоединения CDR VH мышинного mAb 2G1 к кодируемой человеческой VH зародышевой линии с сохранением рамки считывания (16901). Аминокислотная последовательность сигнального пептида подчеркнута, а последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 выделена жирным шрифтом и заштрихована.

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности гуманизированной варибельной области

легкой цепи (VL) mAb 2G1 (гуманизированного 2G1 VL-1901) представлены на фиг. 24. Гуманизация была достигнута путем присоединения CDR VL мышинового mAb 2G1 к кодируемой человеческой VL зародышевой линии с сохранением рамки считывания (1901). Аминокислотная последовательность сигнального пептида подчеркнута, а последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 выделена жирным шрифтом и заштрихована.

Способность гуманизированного 2G1 (VH-11801/VL-1901) реагировать с C5 человека показана на фиг. 25. Гуманизированное 2G1 (VH-11801/VL-1901) экспрессировалось как mAb против человеческого IgG4 с мутацией S228P в Fc-домене. Планшет покрывали человеческим C5. После инкубирования с серийно разведенным гуманизированным 2G1 (VH-11801/VL-1901), связанное mAb детектировали с использованием ПХ-конъюгированного антитела против человеческого IgG4. Гуманизированное 2G1 (VH-11801/VL-1901) связывалось с C5 человека в зависимости от дозы.

Способность гуманизированного 2G1 (VH-16901/VL-1901) реагировать с C5 человека показана на фиг. 26. Гуманизированное 2G1 (VH-16901/VL-1901) экспрессировалось как mAb против человеческого IgG4 с мутацией S228P в Fc-домене.

Планшет покрывали человеческим C5. После инкубирования с серийно разведенным гуманизированным 2G1 (VH-16901/VL-1901), связанное mAb детектировали с использованием ПХ-конъюгированного антитела против человеческого IgG4. Гуманизированное 2G1 (VH-16901/VL-1901) связывалось с C5 человека в зависимости от дозы.

Влияние гуманизированного 2G1 (VH-11801/VL-1901) на гемолиз, опосредуемый классическими путями комплемента, показано на фиг. 27. Гуманизированное 2G1 (VH-11801/VL-1901) экспрессировалось как mAb против человеческого IgG4 с мутацией S228P в Fc-домене. Сенсibilизированные овечьи RBC инкубировали с 10% NHS, содержащей серийно разведенное гуманизированное 2G1 (VH-11801/VL-1901), при 37°C в течение 1 ч. Лизис RBC определяли путем измерения оптической плотности OD_{405нм}. Гуманизированное 2G1 (VH-11801/VL-1901) в значительной степени ингибировало лизис овечьих эритроцитов, опосредуемый 10% NHS, при 10 мкг/мл и при более высоких концентрациях mAb.

Влияние гуманизированного 2G1 (VH-16901/VL-1901) на гемолиз, опосредуемый классическими путями комплемента, показано на фиг. 28. Гуманизированное 2G1 (VH-16901/VL-1901) экспрессировалось как mAb против человеческого IgG4 с мутацией S228P в Fc-домене. Сенсibilизированные овечьи RBC инкубировали с 10% NHS, содержащей серийно разведенное гуманизированное 2G1 (VH-16901/VL-1901), при 37°C в течение 1 ч. Лизис RBC определяли путем измерения оптической плотности OD_{405нм}. Гуманизированное 2G1 (VH-16901/VL-1901) в значительной степени ингибировало лизис овечьих эритроцитов, опосредуемый 10% NHS, при 10 мкг/мл и при более высоких концентрациях mAb.

Раскрытие каждого и всех цитируемых в настоящем документе патентов, патентных заявок и публикаций включено в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки.

Хотя настоящее изобретение раскрыто со ссылкой на конкретные варианты его осуществления, однако, очевидно, что в него могут быть внесены и другие варианты и изменения другими специалистами в данной области, и эти варианты и изменения не должны выходить за рамки истинного существа и объема изобретения. Прилагаемая формула изобретения должна включать все такие варианты и эквивалентные изменения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое специфически связывается с C5 человека, где антитело содержит по меньшей мере одно антитело, выбранное из группы, состоящей из

а) антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), где VH содержит

i) VH-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, или ее вариант, где вариант сохраняет основные биологические свойства и содержит консервативные замены, содержащий до 3, 2 или 1 аминокислотных замен;

ii) VH-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, или ее вариант, где вариант сохраняет основные биологические свойства и содержит консервативные замены, содержащий до 3, 2 или 1 аминокислотных замен; и

iii) VH-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, или ее вариант, где вариант сохраняет основные биологические свойства и содержит консервативные замены, содержащий до 3, 2 или 1 аминокислотных замен; и где VL содержит

i) VL-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, или ее вариант, где вариант сохраняет основные биологические свойства и содержит консервативные замены, содержащий до 3, 2 или 1 аминокислотных замен;

ii) VL-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, или ее вариант, где вариант сохраняет основные биологические свойства и содержит консервативные замены, содержащий до 3, 2 или 1 аминокислотных замен; и

iii) VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, или ее вариант,

вательность SEQ ID NO:51 или ее вариант, где вариант сохраняет основные биологические свойства и содержит консервативные замены.

31. Антитело по п.1, где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56 или ее вариант, где вариант сохраняет основные биологические свойства и содержит консервативные замены.

32. Антитело по п.1, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, или ее вариант, где вариант сохраняет основные биологические свойства и содержит консервативные замены, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56, или ее вариант, где вариант сохраняет основные биологические свойства и содержит консервативные замены.

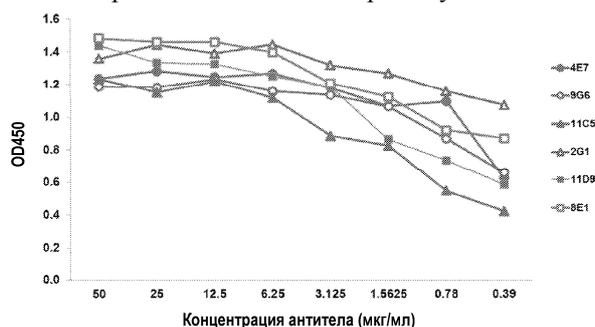
33. Способ лечения заболевания или расстройства, опосредованного путями комплемента, у индивидуума, где указанный способ включает стадию введения указанному индивидууму анти-C5-антитела по любому из пп.1-32; где заболевание или расстройство по меньшей мере выбрано из группы, состоящей из дегенерации желтого пятна (MD), возрастной дегенерации желтого пятна (AMD), ишемического реперфузионного повреждения, артрита, ревматоидного артрита, волчанки, язвенного колита, инсульта, постхирургического системного воспалительного синдрома, астмы, аллергической астмы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), синдрома пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), тяжелой миастении, нейромиеелита зрительного нерва (NMO), рассеянного склероза, отсроченной функции трансплантата, отторжения, опосредуемого антителом, атипического гемолитического уремического синдрома (aHUS), окклюзии центральной вены сетчатки (CRVO), окклюзии центральной артерии сетчатки (CRAO), буллезного эпидермолиза, сепсиса, трансплантации органов, воспаления, воспаления, ассоциированного с операцией по сердечно-легочному шунтированию и с почечным диализом, С3-гломерулопатии, мембранозной нефропатии, IgA-нефропатии, гломерулонефрита гломерулонефрита, опосредуемый цитоплазматическим антителом против нейтрофилов (ANCA), волчаночного нефрита, ANCA-опосредованного васкулита, HUS, индуцированного Шига-токсином, и потери плода, индуцированной антифосфолипидным антителом, или любых их комбинаций.

34. Способ снижения активности системы комплемента у индивидуума, где указанный способ включает введение антитела индивидууму способом, выбранным из группы, состоящей из энтерального введения, парентерального введения и их комбинации, и где антитело представляет собой антитело по любому из пп.1-32, где заболевание или расстройство по меньшей мере выбрано из группы, состоящей из дегенерации желтого пятна (MD), возрастной дегенерации желтого пятна (AMD), ишемического реперфузионного повреждения, артрита, ревматоидного артрита, волчанки, язвенного колита, инсульта, постхирургического системного воспалительного синдрома, астмы, аллергической астмы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), синдрома пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), тяжелой миастении, нейромиеелита зрительного нерва (NMO), рассеянного склероза, замедления функции трансплантата, отторжения, опосредуемого антителом, атипического гемолитического уремического синдрома (aHUS), окклюзии центральной вены сетчатки (CRVO), окклюзии центральной артерии сетчатки (CRAO), буллезного эпидермолиза, сепсиса, трансплантации органов, воспаления, воспаления, ассоциированного с операцией по сердечно-легочному шунтированию и с почечным диализом, С3-гломерулопатии, мембранозной нефропатии, IgA-нефропатии, гломерулонефрита гломерулонефрита, опосредуемый цитоплазматическим антителом против нейтрофилов (ANCA), волчаночного нефрита, ANCA-опосредованного васкулита, HUS, индуцированного Шига-токсином, и потери плода, индуцированной антифосфолипидным антителом, или любых их комбинаций.

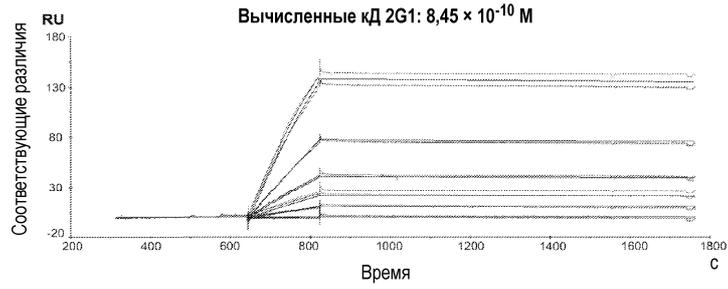
35. Способ по п.34, где антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, scFv и их комбинаций.

36. Клетка, для получения по меньшей мере одного антитела, которое специфически связывается с C5 человека, где клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, по меньшей мере, по любому из пп.1-32.

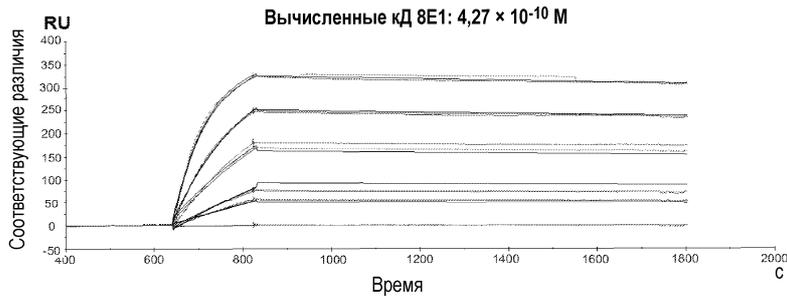
37. Клетка по п.36, где клетка представляет собой гибридому.



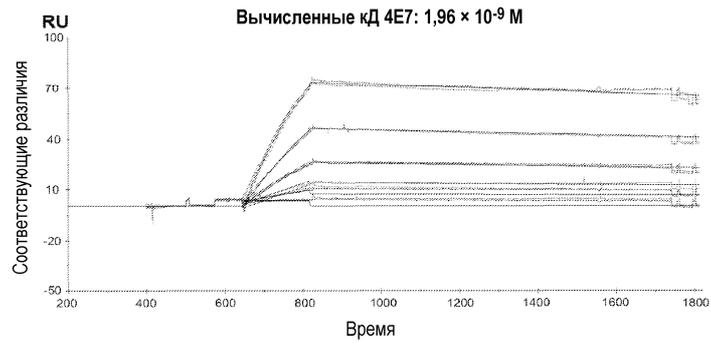
Фиг. 1



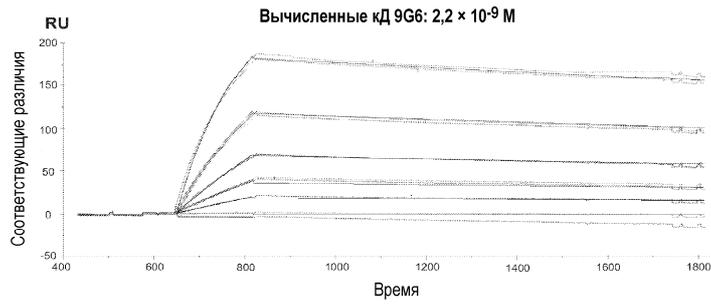
Фиг. 2



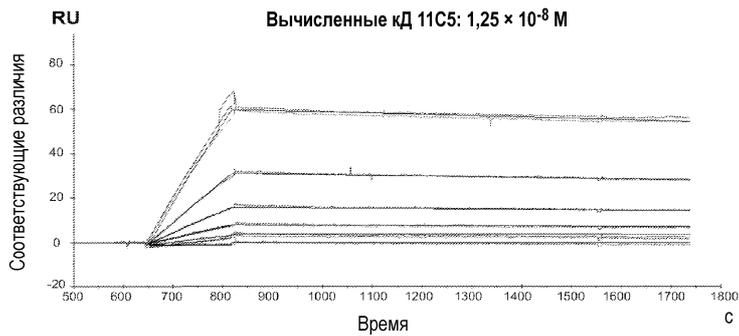
Фиг. 3



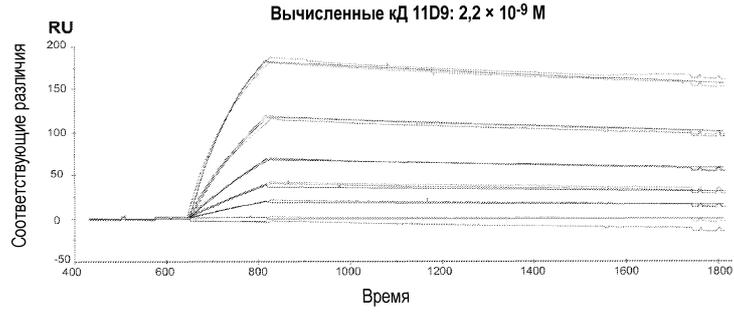
Фиг. 4



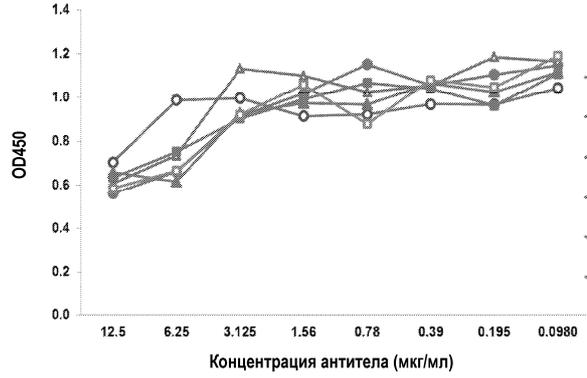
Фиг. 5



Фиг. 6

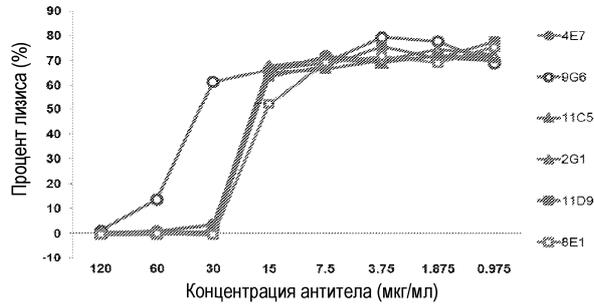


Фиг. 7



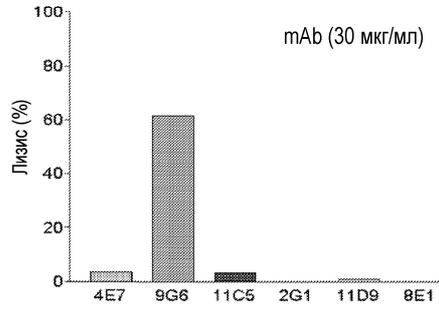
Фиг. 8

А Овечьи эритроциты – 50% человеческая сыворотка

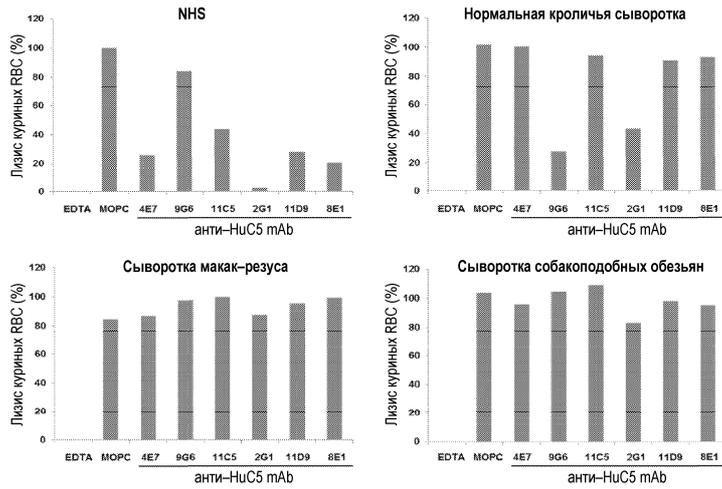


В

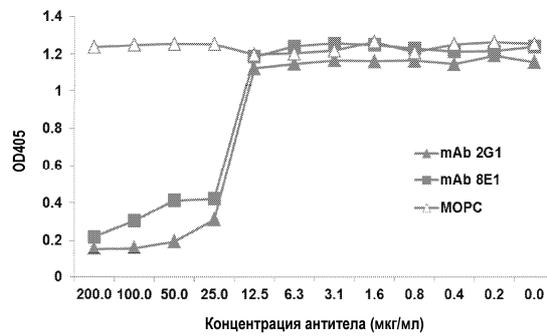
Овечьи эритроциты – 50% человеческая сыворотка



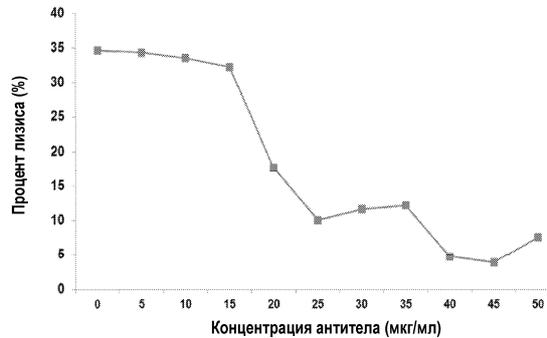
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

Последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислотная последовательность VH mAb 2G1. Сигнальный пептид подчеркнут, а последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 выделены жирным шрифтом и заштрихованы серым.

```

AACACACATCTGTCGCAATGTCCTCTCCACAGGCACCTGAACACACTGACTCTAACCC
atggatggagatggatctctctctctctctctcaggaactgcaaggtctctctctctgag
M G H S P I F I L F L S S T A G V L S E F
gtccagctgcaacagttctggscagagctgtgagcctggggttcagtgaagatctcc
V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S
tgcaggctcttgatcaccaatccagactacaatttgaactgggtgagcagagcact
C R A S G Y T T T D Y N I D N V K Q S H
ggaaagccttgatggatggagatattgactcaactatggtatactatactacaac
G K S L E W I G D I S P N Y G Y T I Y N
cagaattccaggcaagggccacttgactgtagacaggtctccagcagagcctacatg
Q K E K D K A T L T V D R S S S T A Y M
ggctccggagcctgcaactctggagcactgaggttatactgtgcaagagggcaatt
E L R S L T S K E T A V Y U S A R R D I
cgttaactcgttaattcctcaaatgctactctcagatgctcggggcacagggaccagctc
R Y S G M S Y K W Y F D V W G S T V
acgtctctcagcagcaaacagcccaactcgtctatccactggcc (SEQ ID NO: 1)
T V S S (SEQ ID NO: 2)
    
```

CDR1 (SEQ ID NO: 3)
 CDR2 (SEQ ID NO: 4)
 CDR3 (SEQ ID NO: 5)

Последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислотная последовательность VL mAb 2G1. Сигнальный пептид подчеркнут, а последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 выделены жирным шрифтом и заштрихованы серым.

```

tcagttctcggaggcaacagtttagatagaggttccaggtccaggttctggggtcctt
M R F Q V Q V L G E L L
ctgctctggatcaggtgcaagctggtgctccagataaccagctctcactctctctct
L L H I S G A Q C P V Q I T Q S R S Y L
gctgcatctcctggcaaaccttactatttaattgcaggcaagtaagagcataagcaaa
A A S P G E T I T I N C R T S K S I S K
tatttagctggatccagagaaactgggaaactataagctctctctctctctctctgga
Y S A N I Q R E R P G E R N K L L I Y S G
tccacttgcaatctgcaattccatccagaggttcagggtcaggtggtatctgtaacagattc
S T L Q S G I P S R F R G S G S G T D F
actctcaacatcagtagctgagctgaaattttgcaatgattactgtcaacaacat
T L T I S L E R E D F A N Y Y C Q Q H
aatgataccctgcaactctggagggggcccaagctgaaataaaacaggtctgctgct
N E Y P Y T F G G G T K L E I K (SEQ ID NO: 7)
gcaaca (SEQ ID NO: 6)
    
```

CDR1 (SEQ ID NO: 8)
 CDR2 (SEQ ID NO: 9)
 CDR3 (SEQ ID NO: 10)

Фиг. 13

Последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислотная последовательность VH mAb 8E1. Сигнальный пептид подчеркнут, а последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 выделены жирным шрифтом и заштрихованы серым.

ACCCCTCCATCAGACatggtgctctcggggctgctctctgctggtgacttcccaagc
M A V L P L L L C L V T P P S
tgtgtcctgtcccaggtgcagctgaaggagtcaggacctggcctgggtggccctccag
C V L S Q V Q L K E S C P C L V A P S Q
agcctgtccatcacatgcaagcgtctcagggtcccttcaaacactatggaatcacctgg
S D S I T C T V S G P E L N N H H N
gttcgcagcctccaggaagaggtctggactggctggcaatgatgagtgatggaaga
V R Q P P P G K G L E W L A V I X W S D G R
acaacctataattcagctctcaactccagactgagcactcagcaaggacaactccaagagc
P T Y N S A L N S R L S I S R D N S K S
caagtttctctcaaaagcaagcgtctccaaactgtgacacactgtgactctgtggcc
Q V F P R M N S L Q T D D T A M V V C A
agacatgagtgctgggggactatagtaggactactgggttcaaggaacctcagtcacc
R H D G R G D Y S M D Y W G Q G T S V T
ctctctcagccaaaacaacccccatca (SEQ ID NO: 11)
V S S (SEQ ID NO: 12)

Последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислотная последовательность VL mAb 8E1.

atggggaagcatctctctctccagctctcagagatggagacagacacactcctgttatgg
M E T D T L L L W
gtactgctgctctgggcncttagtccagagctcgtgagacacagctctcctgattccctfa
V L L L S L L S L L V M T Q S P A S L
gtgtatctctggggcaagggccacctctcagtcagggccagcaaaaggttcagtaca
V V S L G O R A T I S C R A S K K G V S R
tctgtctacagttatagcactgttaccacaagaaaccaggacagcccaaccaactctc
S V Y S Y M H W Y Q Q K P G Q P P R L L
atctctctctcccaacactcaaaactctgggtccctgcagagctcagggcagtggtctc
I Y L A S N L E R S V D P A R E S G S C S
gggcaagactctccctcaacatccactctgtggaggaggaggtgctgcaactattac
G T D P S L N I H P V R E E D A A T Y Y
tgtccagcaagtgggagcttccgctcagctcctggttgggacaaagctggagctgaaa
Q Q S S E L L L F T F A G T K L E L K
cgggtatgctgccaacaagggc (SEQ ID NO: 16)
R (SEQ ID NO: 17)

Фиг. 14

Последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислотная последовательность VH mAb 4E7. Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 выделены жирным шрифтом и заштрихованы серым.

atggggaaacaacatagtccaatgtctctctccagacactgaaacacactgacttaacc
M S S E Q T L N T L T L F
atgggatggagctggatctctctctctctcagcaaacgcagagctcctctctggg
M C N S W I P L F L S E T Q S Y L S E
gtccagctgcaacaggggctcagtgaaagtgtccctgtaagactctcagtaactcttc
V Q L Q Q G A S V K M S C K T S R Y S F
actgactacatcatgcaactgggtgaagctgagccatgaaagacccctgagtgattgga
H D Y T M H W V K L S H G H S L E W I G
tatattcaacctcaacatgggtgactatctcaaacagaaactcaaaaacaagcaaca
Y I N P N N G G T I I X N N Q K I K K D K A T
tgtactgtaaacagctctccagcagcctacatggaattccgcagctgacatcgag
L T V N K S S S T A Y M E P R S L T S R
gattctgagctctctctctctcagaggggggtttattaccgggggttctgcttaotgg
D S A V V F C S G G V I I R G F A Y W
ggcaagggcaactgggtcactgtctctcagcaaacagcccccactct (SEQ ID NO: 21)
G Q G T L V T V S A (SEQ ID NO: 22)

Последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислотная последовательность VL mAb 4E7.

atgggggacnaatattgaaagaatagacctggtttgtgaaattatggcctggatttcaact
M A W I S L
atactctctctctctctcagctcagggccattccacagctgtgtgactcaggaa
I L S L L A L S S G A I S O A V V T Q E
tctgcactcaacacatcaactgggtgaacagtcacactcaactgtgctcaagtaactggg
S A L T T S P G E T T T T C R S S T G
gctgttaccaaacagtaactatgccactgggtccaagaaabaaccaactcaattttcaact
A V T N S N Y A N W V O E K P D H F P T
ggtctcaataggtgttaccacaacccaggtccaggtgttccctggccgatctcaggtccc
G L I G V T N N R G P G V P A R F S G S
ctgattggagacaaggctgcccctccactcagcaggggacagactgagatgagggcaata
L I G D K A A L P T I G A Q T E P E A I
tatctgtgctctatggtcacagcaaccactgggttccgggtggaggaaccaactgac
Y P C A L W Y S N H I G V R W R N Q T D
tgtctagggccagcccaagctctcagcactcagt (SEQ ID NO: 26)
C P R P A Q V F A I S (SEQ ID NO: 27)

Фиг. 15

Последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислотная последовательность VH mAb 9G6. Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 выделены жирным шрифтом и заштрихованы серым.

atggggaagggagtgaccagctagctttaaaggcacactgagcccaagctctgacatcactg
M
gattgggtgagcaactggattctctgatgacagctgcccagaagtgcacaagcacaagatc
D W V W T L V F L I A A A Q S A Q A O I
cagtgggtgcactggacctgagctgaagagcctggagagcaagctcaagatctcctgc
Q L W Q S G P E L K P G E T V V E I S C
aaggctctgggtatccttccagaaatccaatgcactgggtgagcaggtccagga
K A S G Y T F T E Y P M H W V K Q A E G
aagattccaaagtgagtgatctctatacaccacactgagagcaaatatctgtgaa
F S P E W M G H Y R D T G R R P T Y A R
gattcaggggaggggttgcctctcttggagacctgcaagcaactgctctatttggag
E F R G R F A F S L E T S A S T A V L Q
atcaaacctccaaaatgagggcagcgtacatctctgttctcactaggtcactca
F N N S R N P D T A F V P C V H S G V Y
ggctactggggccaagccactctcagctctcagccaaaacaacccccatca (SEQ ID NO: 30)
G Y W G Q G T T L T V S S (SEQ ID NO: 31)

Последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислотная последовательность VL mAb 9G6. Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 выделены жирным шрифтом и заштрихованы серым.

atgggggtgtaatcagcatcacctgaaacaacacagcaatgagtggtgcccactcaggtc
M S V P T Q V
ctgggggtgctgctgtgcttaccaggtgcccagatgacatccagtgactcagctctc
S L L T S A R S D I Q H T Q S
ccagctccctcactcagctctgtgggcaactgtccctctcaactgtcggcaagtgg
F A S L S A S V G E T V T F T C R A S E
attattacagttatttatttggattcagcagaacaggggaaactctcctcagctcctg
E H Y S Y L W W Y Q Q K Q C K S P Q L L
gtcttaattgcaaaaaccttagcaggggtgcccactcaaggttcaagtgcaagtgatca
V S N A K T L A E G V P S R F S G S C S
ggcaacagctttctctgaaagatcagctcagcctgagactgagatttggaggttatca
G T Q P S L R I N S L Q P E D P F G S Y Y
tgtcaacattatttggtaactctccagcttccaggggggcaacagctggaaataaaa
C H Y Y G N P P P T F G G G T K L E I K
cgg (SEQ ID NO: 35)
R (SEQ ID NO: 36)

Фиг. 16

Последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислотная последовательность VH mAb 11C5. Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 выделены жирным шрифтом и заштрихованы серым.

acatgggggtctgtgacagaggagggcggtctggattogagttcoctcacattcagtgatg
M
agcactgaacacggaccocctcaccatgaaacttggggtcagotgtattttctgtcctt
E T E H Q P L T M N N F P L E L I F L V L D
gttttaaagggtccagtgatgaaagtgacgtagtgagtggtggggagggattgtaag
V L K C V Q C E V Q L V E S G C G L V K
cctggaggggtccctgaaactctctgtgacgocctggatcactttcactaccatgccc
P G G S L K L S C A A S G F T F T T Y A CDR1 (SEQ ID NO: 42)
atgctctgggttcgpcagactccgaaagagcgctggagtggtcgaaccctatgct
M S W V R Q C P E K R L E W V A T I S A
ggtggtacttacactactattcagacaatgtaaggccgattccaccatccagagac
G T Y T Y Y S D N V K G R F T I S R D CDR2 (SEQ ID NO: 43)
aatgccaagaacaacctgtacctgcaaatgagccatctgaagtctgaggacacagccatg
N A K N N L I L Q M S H L K S E D T A M
tttctactgtgcaagtgatcccgattactactagtagaagccgtttggttactgggcaaa
F Y C A R D P D Y Y C R S P F A Y W G Q CDR3 (SEQ ID NO: 44)
gggactctggctcctgtctgtgacccaacaacccccatca (SEQ ID NO: 40)
G T L V T V S A (SEQ ID NO: 41)

Последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислотная последовательность VL mAb 11C5. Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 выделены жирным шрифтом и заштрихованы серым.

atgggggtgagccacacaactcagggaaagctcgaagatggtttcacactcagatactt
M M V T T F Q Q T L
ggacttatggtttttggattcagcctccagaggtgaaattgtgctcactcagttccca
S L M L F W I S A S R G E I V L T Q S P
gccacccgtctgtgactccagagagagcgtcagttctctgtaggccagccaaagt
A T L S V T P G E S V S L S C R A S Q S CDR1 (SEQ ID NO: 47)
attgcaacaacctcagtggtatcaacaaaatcacatgagctccagactctctcactc
H S W N I Q W Y Q Q K S H E S P R L S I
aaatgcttcccaqtcactctctgggacccctccaggttcagtggtgagtgatcaggg
K Y A S Q S I S G I P S R F S G S G S G CDR2 (SEQ ID NO: 48)
acagattcactctcagtatcaacagtggtgagactgaagatttgggaatgtattctgt
T D F T L S I N S V E T E D F G M Y F C
caacagagtaacagctcctcactcctcgttgggtgggcaaacaggtgagtgaaacgg (SEQ ID NO: 45)
Q Q S N S W F P L T F G G G T K V E L K R CDR3 (SEQ ID NO: 49)
(SAQ ID NO: 46)

Фиг. 17

Последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислотная последовательность VH mAb 11D9. Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 выделены жирным шрифтом и заштрихованы серым.

atggggacatattgacaatgtccctcaccacagacactgaaacacactgactc taaccatggga
M S S F Q T L N D F L L T M G
tggagctggatctttctctctctcctgtcaggaactgcaggtgctcctctctgaggtccag
W S W I F L F L L S G T A G V L S E V Q
ctgcaacaactctggacctgagtggtgaagcctggggcttcagtgagatactctgtaag
L Q O S G P E V V K F C A S V K I S C K
gctctggatacaggtcactgactctcactgaaactgggtgaaacagagccatggaaag
A S G Y T F T D E F Y M N W V K Q S H G K CDR1 (SEQ ID NO: 52)
agccttgagggatggatataattaaactgaaactgggtcactcagttacaaccagaag
S L L N T Q Y H N N K Y Y Q K
ttcaaggccaaggccacatcgactgtagacaggtctcccaacacagcctaatggagctc
K K G K A T S T V D R S S N T A Y M E L CDR2 (SEQ ID NO: 53)
cgcagctgacatctgaggctctgagctcttactctctctctctctctctctctctctctct
R S L T S E D S A V Y Y C A R L I F Y Y G CDR3 (SEQ ID NO: 54)
aactggatcttggatgtggggcacagggaccagctcaccgtctcctcagccaaaaca
N W Y F D V W G T G T T V T V S S A K T (SEQ ID NO: 51)
acagcccatcg (SEQ ID NO: 50)

Последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислотная последовательность VL mAb 11D9. Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 выделены жирным шрифтом и заштрихованы серым.

atggggaaataattagccagagactgagatgggaaacaaaaatggattttagatgcagatt
M D F Q M Q I
atcagcttgcgttaatacagtgacacagtcacagtcacagtcacagtcacagtcacagtcac
I S L L L I S V T V I V S N O E I V L T
cagttccaccaccatggctgactctccggggagagatcactatccactgcagtgccc
Q S P P T M A A S P G E K I T I T C S A CDR1 (SEQ ID NO: 57)
agctcaagatagaagttccaattacgtgcattgggtatcagcagaaagcaggattctccct
S S S I S S N Y V H W V Q Q K P G F S P
aaactctgattctcagcaatccactcctgggtctggagcccagctcagctcagctcagctc
F L L T V R T S N L A S G V F V R F S G
agtggtctgggactcttactctctcacaattggccaccatggagctgagatgttgccc
S G S G T S Y S L T I G T M E A E D V A
acttactactgcccagggtagtataccgtggacgttcgggtggaggccacaaggtg
T Y Y C Q G T S I P W T F G G G T K V CDR3 (SEQ ID NO: 59)
gaaattaatogg (SEQ ID NO: 55)
E I N R (SEQ ID NO: 56)

Фиг. 18

Эти последовательности были использованы для конструирования химерного (мышиня переменная область + человеческая константная область) и гуманизованного (гуманизованная мышиня переменная область + человеческая константная область) антитела против человеческого C5 (2G1).

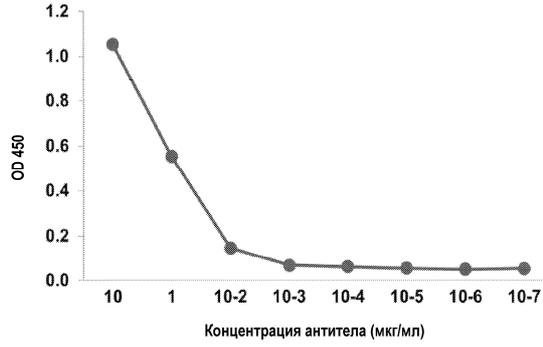
Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи человеческого IgG4 с мутацией S228P. Пролиновый остаток в положении 228 показан серым.

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMSIRPEVTCVVVDVSDPEVFQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIK
AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVSFCSVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG
K (SEQ ID NO: 60)

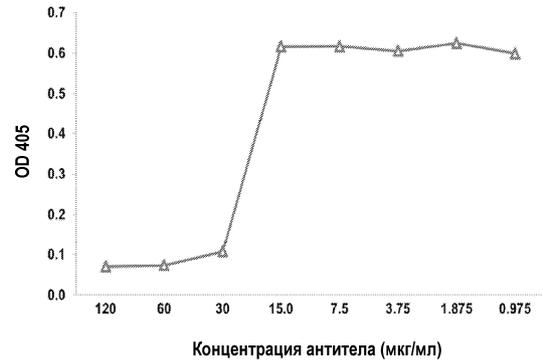
Аминокислотная последовательность константной области человеческой легкой цепи каппа.

TVAAPSFHPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 61)

Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21

Гуманизованное 2G1 VH-11801

```

cagcatalgatcagtgctctctccaaagtccttgaacatagactctaaccatggactggacc
M D W T
tgggtttttctctctctctctcagtaactgcaggtgtccactcccagggtcagctgggtg
W V F L F L L S V T A G V H S Q V Q L V
cagctcgggctgaggtgaagaagcctgggctcagtgaaaggtctctcgaagctctct
Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S
G Y T I T D Y N L D W V R Q A P G Q G L CDR1 (SEQ ID NO: 64)
gagtgatgggagatattagctctaactatggttatactatctacaaccagaattcaag
E W M G D I S P N Y G Y T I Y N Q K F K CDR2 (SEQ ID NO: 65)
gcagagtcaccatgaccacagacacatccacgagcacagcctacatggagctgagagc
D R V T M T T D T S T S T A Y M E L R S
ctgagatctgacgacacggcgtgtattactgtgagagaaggacattcgttactccggt
L R S D D T A V Y Y C A R R D I R Y S G CDR3 (SEQ ID NO: 66)
aattcctacaatggtactctcagtgctcggggccaaaggacaaatggtcaccgtctctcca
(S EQ ID NO: 62)
N S Y K W Y F D V W G Q G T M V T V S S (SEQ ID NO: 63)
    
```

Фиг. 22

Гуманизованное 2G1 VH-16901

```

cagcatalgatcagtgctctctccaaagtccttgaacatagactctaaccatggactggacc
M D W T
tgggtttttctctctctctcagtaactgcaggtgtccactcccagggtcagctgggtg
W V F L F L L S V T A G V H S Q V Q L V
cagctcgggctgaggtgaagaagcctgggctcagtgaaaggtctctcgaagctctct
Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S
G Y T I T D Y N L D W V R Q A P G Q G L CDR1 (SEQ ID NO: 69)
gagtgatgggagatattagctctaactatggttatactatctacaaccagaattcaag
E W M G D I S P N Y G Y T I Y N Q K F K CDR2 (SEQ ID NO: 70)
gcagagtcacgattaccgggacgaatccacgagcacagcctacatggagctgagcagc
D R V T I T A D E S T S T A Y M E L S S
ctgagatctgagacacggcgtgtattactgtgagagaaggacattcgttactccggt
L R S E D T A V Y Y C A R R D I R Y S G CDR3 (SEQ ID NO: 71)
aattcctacaatggtactctcagtgctcggggccaaaggacaaatggtcaccgtctctcca
(S EQ ID NO: 67)
N S Y K W Y F D V W G Q G T M V T V S S (SEQ ID NO: 68)
    
```

Последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислотная последовательность VL гуманизованного 2G1. Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 выделены жирным шрифтом и заштрихованы серым.

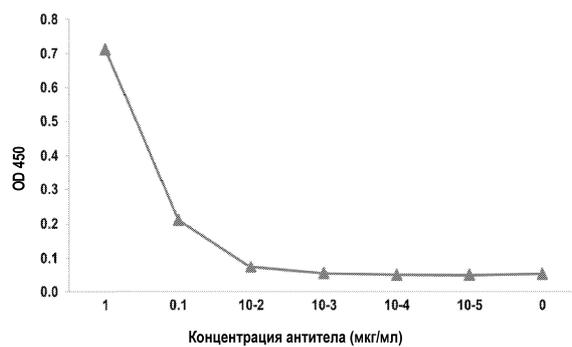
Фиг. 23

Гуманизованное 2G1 VL-1901

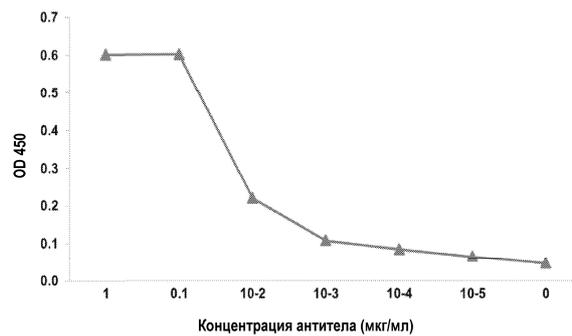
```

gtcagagccctggggaggaaactgctcagttaggacccagagggaaccatggaagcccagct
M E A P A
cagctctctctctctctctctcagtaactgcaggtgtccactcccagggtcagctgggtg
Q L L F L L L W L P D T T G D I Q L T
cagctccatcctctctctctctcagtgatcagtgagagacagagtcaccatcacttgcaggaca
Q S P S F L S A S V G D R V T I T C R T CDR1 (SEQ ID NO: 74)
agtaagagcatabaagcaaatatttagcctggatcagcaaaaaccagggaagcccctaag
S K S I S K Y L A W Y Q Q K P G K A P K
ctcctgatctattctggatccaacttgcattctggggtcccatcaagggtcaagcggcagt
L L I Y S G S T L Q S G V P S R F S G S CDR2 (SEQ ID NO: 75)
ggatctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctcagcctgaagatcttgcact
G S G T E F T L F I S L Q F E D F A T
tattactgtcaacaacataatgaataaccgtaacggttggccaggggacaaagctggag
Y Y C Q Q H N E Y F Y T F G Q G T K L E CDR3 (SEQ ID NO: 76)
atcaaa (SEQ ID NO: 73)
I K (SEQ ID NO: 73)
    
```

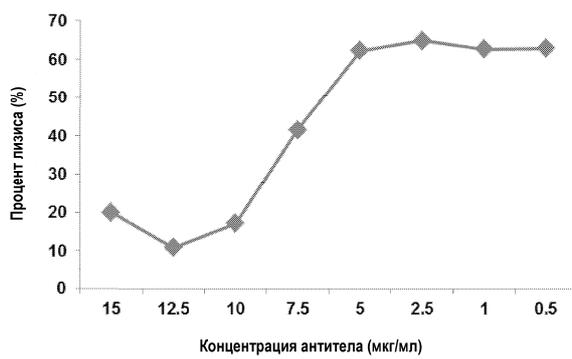
Фиг. 24



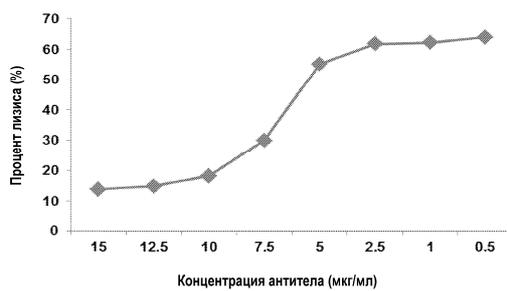
Фиг. 25



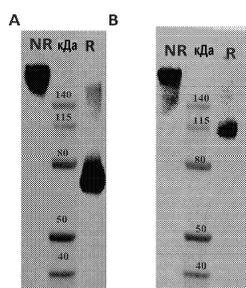
Фиг. 26



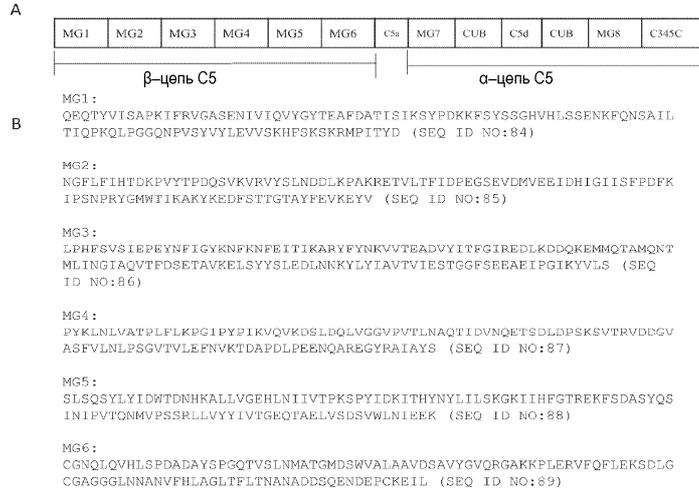
Фиг. 27



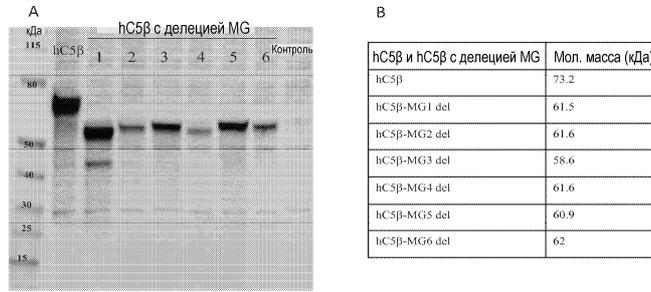
Фиг. 28



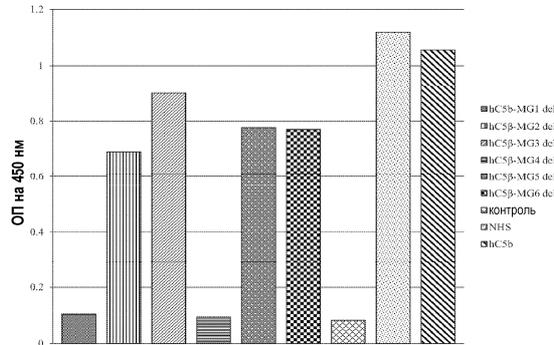
Фиг. 29



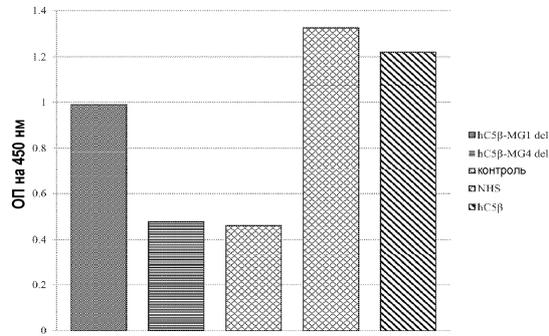
Фиг. 30



Фиг. 31



Фиг. 32



Фиг. 33

