

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292203 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.03

(51) Int. Cl. C07K 16/18 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.05.06

(54) ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА К C5a

(31) 20173255.9

(32) 2020.05.06

(33) EP

(86) PCT/EP2021/061940

(87) WO 2021/224366 2021.11.11

(71) Заявитель:
ИНФЛАРКС ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:

Го Жэньфэн (US), Ридеманн Нильс К.
(DE)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с конформационным эпитопом C5a человека. Настоящее изобретение, в частности, относится к гуманизированным антителам к C5a. Антитела, описанные в настоящем документе, можно применять в качестве активных агентов в фармацевтических композициях. Антитела и фармацевтические композиции особенно подходят для лечения и предотвращения заболеваний или нарушений, в которые вовлечена патологическая активность C5a.

A1

202292203

202292203

A1

ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА К C5a

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с
5 конформационным эпитопом C5a человека. Настоящее изобретение, в частности,
относится к гуманизированным антителам к C5a. Антитела, описанные в настоящем
документе, можно применять в качестве активных агентов в фармацевтических
композициях. Антитела и фармацевтические композиции особенно подходят для
лечения и предотвращения заболеваний или нарушений, в которые вовлечена
10 патологическая активность C5a.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

C5a

C5a является продуктом расщепления его «материнской молекулы» C5, состоит
15 из 74 аминокислот и является одной конечной точкой каскада активации комплемента.
Он может быть получен путем активации по меньшей мере трех хорошо описанных
путей (альтернативный, классический и лектиновый (маннозный) путь). Все пути
объединяются на уровне C3 с образованием C5- или альтернативной C5-конвертазы,
обеспечивающей расщепление C5 на C5a и C5b. Последний связывается с молекулами
20 C6, C7, C8 и множеством молекул C9, что в конечном итоге приводит к образованию
пор, например, в мембранах бактерий (терминальный мембраноатакующий комплекс =
МАК). C5a образуется, когда система комплемента активируется в условиях воспаления
и других иммунологических и воспалительных нарушений/заболеваний.

Из всех продуктов активации комплемента C5a является одним из наиболее
25 активных воспалительных пептидов с широким спектром функций (Guo and Ward 2005).
C5a оказывает свое действие через высокоаффинные рецепторы C5a (C5aR и C5L2)
(Ward 2009). C5aR принадлежит к семейству родопсиновых рецепторов, связанных с G-
белком, с семью трансмембранными сегментами; C5L2 имеет сходную структуру, но, по-
видимому, не связан с G-белком. В настоящее время считается, что C5a выполняет свои
30 биологические функции главным образом благодаря взаимодействию C5a-C5aR,
поскольку для взаимодействия C5a-C5L2 было обнаружено мало биологических ответов.
Однако последние сообщения демонстрируют передачу сигналов также посредством
активации C5L2 (Rittirsch et al. 2008).

C5aR широко экспрессируется на миелоидных клетках, включая нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и моноциты, и немиелоидных клетках во многих органах, в частности, в легких и печени, что указывает на важность передачи сигналов C5a/C5aR. Обширное положительное регулирование экспрессии C5aR происходит во время начала сепсиса, и блокада взаимодействия C5a/C5aR антителами к C5a или антителами к C5aR, или антагонистами C5aR оказывает сильные защитные эффекты в моделях сепсиса на грызунах (Czernak et al. 1999; Huber-Lang et al. 2001; Riedemann et al. 2002).

C5a выполняет множество биологических функций (Guo and Ward 2005). C5a является сильным хемоаттрактантом для нейтрофилов, а также обладает хемотаксической активностью в отношении моноцитов и макрофагов. C5a вызывает окислительный взрыв (потребление O_2) в нейтрофилах и усиливает фагоцитоз и высвобождение гранулированных ферментов. Также было обнаружено, что C5a является сосудорасширяющим средством. Было показано, что C5a участвует в модуляции экспрессии цитокинов из различных типов клеток и повышает экспрессию молекул адгезии на нейтрофилах. Высокие дозы C5a могут привести к неспецифической хемотаксической «десенсибилизации» нейтрофилов, вызывая тем самым обширную дисфункцию. Многие воспалительные заболевания связаны с эффектами C5a, включая сепсис, острое поражение легких, воспалительное заболевание кишечника, ревматоидный артрит и другие. В экспериментальных условиях сепсиса воздействие C5a на нейтрофилы может привести к дисфункции нейтрофилов и параличу сигнальных путей, что ведет к дефектной сборке НАДФН-оксидазы, параличу сигнальных каскадов МАРК, сильному подавлению окислительного взрыва, фагоцитоза и хемотаксиса (Guo et al. 2006; Huber-Lang et al. 2002). Апоптоз тимоцитов и отсроченный апоптоз нейтрофилов являются двумя важными патогенными событиями для развития сепсиса, которые зависят от присутствия C5a. Во время экспериментального сепсиса C5a усиливает экспрессию $\beta 2$ -интегрина на нейтрофилах, чтобы стимулировать миграцию клеток в органы, которая является одной из основных причин полиорганной недостаточности (ПОН). Также обнаружено, что C5a обусловлен активацией пути коагуляции, который происходит при экспериментальном сепсисе. C5a стимулирует синтез и высвобождение из лейкоцитов человека провоспалительных цитокинов, таких как ФНО- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 и фактор ингибирования миграции макрофагов (от англ. macrophage migration inhibitory factor, MIF). Учитывая, что активация комплемента является событием, происходящим во время возникновения острого воспаления, C5a может начать действовать до появления большей части воспалительной «цитокиновой бури». По-

видимому, C5a играет ключевую роль в организации и усилении работы цитокиновой сети и формировании синдрома системного воспалительного ответа (ССВО).

В иммунологической регуляторной сети, связанной с адаптивным иммунитетом, C5a влияет на перекрестные взаимодействия между дендритными клетками (ДК) и $\gamma\delta$ Т-клетками, и это может привести к значительной выработке медиаторов воспаления, таких как IL-17 (Xu et al. 2010). Существенная роль C5a была установлена и определена в генерации патогенных ответов клеток Th17 при системной красной волчанке (СКВ) (Pawarja et al. 2014). Кроме того, сообщалось, что C5a является ключевым регулятором для регуляторных Т-клеток, обеспечивающим мощный подавляющий эффект в отношении размножения и индукции регуляторных Т-клеток (Strainic et al. 2013). Учитывая тот факт, что регуляторные Т-клетки и клетки TH17 являются основными участниками аутоиммунных заболеваний, можно ожидать, что ингибирование передачи сигналов C5a значительно снизит сверхактивный иммунный статус при аутоиммунных заболеваниях.

IFX-1

IFX-1 представляет собой химерное моноклональное антитело IgG4, которое специфично связывается с растворимым продуктом расщепления компонента системы комплемента человека C5a. IFX-1 состоит из 1328 аминокислот, и его приблизительная молекулярная масса составляет 148472 дальтон. Последовательности CDR и FR IFX-1 раскрыты в Таблице 3 WO 2015/140304 A1, также опубликованной как US 2017/0137499 A1. Содержание WO 2015/140304 A1 и US 2017/0137499 A1 полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

IFX-1 экспрессируется в клеточной линии СНО млекопитающих в виде рекомбинантного белка и в конечной форме изготавливается в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ + 0,05% полисорбата 80) для внутривенного введения. Связывание этого антитела с C5a человека облегчает высокоэффективную блокаду C5a-индуцированных биологических эффектов путем предотвращения связывания и взаимодействия C5a с его соответствующими клеточными рецепторами.

Были проведены различные неклинические исследования для оценки фармакологических и токсикологических аспектов IFX-1, которые можно разделить на тесты *in vitro/ex vivo* и исследования *in vivo*, включая токсикологические исследования GLP на яванских макаков (с использованием IFX-1). Ни в одном из проведенных доклинических тестов и исследований не выявлено каких-либо токсикологических

проблем или проблем с безопасностью в отношении IFX-1. Исследование фазы I с участием людей показало, что в лабораторных параметрах безопасности, основных показателях состояния организма и параметрах ЭКГ не было клинически значимых изменений, связанных со временем или дозой.

5 *In vitro* анализ IFX-1 демонстрирует сильную способность к связыванию с растворимым C5a человека, а также высокую блокирующую активность C5a-индуцированных биологических эффектов, таких как высвобождение лизоцима из человеческих нейтрофилов или положительная регуляция CD11b в нейтрофилах цельной крови человека. Одно антитело IFX-1 достигает способности нейтрализовать действие 2
10 молекул C5a с эффективностью, близкой к 100%, в экспериментальных условиях *in vitro*. Клинические исследования IFX-1 продолжаются, чтобы проверить его клиническую эффективность при нескольких воспалительных заболеваниях.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ЗАДАЧИ, ЛЕЖАЩИЕ В ОСНОВЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

15 Антитела, которые специфично связываются с частью C5a, но не с частью C5b C5, описаны в предшествующем уровне техники (Klos et al. (1998) J. Immunol. Meth. 111: 241-252; WO 01/15731; WO 03/015819). Созданные ранее антитела к C5a проявляли только умеренную блокирующую активность в отношении биологических эффектов, индуцированных C5a. В результате этого антитела к C5a предшествующего уровня
20 техники были неспособны полностью блокировать C5a-индуцированные биологические эффекты или должны были быть использованы в суперстехиометрических количествах, чтобы достичь достаточно высокой блокады активности C5a. Авторам настоящего изобретения удалось получить два моноклональных антитела к C5a (названных INab308 и INab708), которые проявляют сильную блокирующую активность в отношении C5a-
25 индуцированных биологических эффектов даже при применении в стехиометрических количествах, то есть 0,5 моль бивалентного антитела на моль C5a (см. WO 2011/063980 A1, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки). На основе моноклонального антитела INab308 авторы настоящего изобретения разработали химерное антитело IFX-1, которое проявляет такую же сильную блокирующую
30 активность (см. WO 2015/140304 A1, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки).

Однако два моноклональных антитела INab308 и INab708, конкретно описанные в WO 2011/063980 A1, представляют собой мышиные антитела. Антитело IFX-1, описанное в WO 2015/140304 A1, представляет собой химерное антитело.

Следовательно, эти антитела могут вызывать нежелательные иммунологические ответы при введении человеку.

Таким образом, с учетом предполагаемого клинического применения у пациентов в предшествующем уровне техники сохраняется потребность в антителах к С5а, которые более сходны с человеческими антителами, но все же проявляют превосходную блокаду активности С5а.

Авторам настоящего изобретения удалось получить гуманизированные антитела к С5а, которые имеют значительно улучшенное сходство с человеческими антителами по сравнению с антителами, описанными в WO 2011/063980 A1 и WO 2015/140304 A1, сохраняя при этом предпочтительные свойства антител, описанных в WO 2011/063980 A1 и WO 2015/140304 A1, а именно проявляют такую же высокую блокирующую активность в отношении С5а-индуцированных биологических эффектов, не влияя на виды биологической активности С5b.

Приведенный выше обзор не обязательно описывает все задачи, которые можно решить с помощью настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), причем указанный домен VH содержит, по существу состоит или состоит из

аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 10 (QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT TFWMDWVRQA PGQGLEWIGR IDPSDSESLR DQRFKDRVTM TVDKSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARGN DGYYGFAFWG QGTLVTVSS, VH4) или

аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, при этом указанная аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, содержит последовательности CDR1H, CDR2H и CDR3H из SEQ ID NO: 20-22, соответственно, и при этом указанная аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, содержит V в положении аминокислоты 5, E в положении аминокислоты 10, K в положении аминокислоты 12, K в положении аминокислоты 13, A в положении

аминокислоты 16, А в положении аминокислоты 40 и/или Т в положении аминокислоты 76, и

причем указанный домен VL содержит, по существу состоит или состоит из

аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 16

5 (DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQSVD YDGDSYMKWY QQKPGKAPKL
LIYAASNLSQSVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSNEDPY
TFGQGTKLEIK, V_K4) или

аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16, при этом указанная аминокислотная

10 последовательность, имеющая по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16, содержит последовательности CDR1L, CDR2L, CDR3L из SEQ ID NO:

23-25, соответственно, и при этом указанная аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16,

содержит А в положении аминокислоты 13, V в положении аминокислоты 15, D в

15 положении аминокислоты 17, V в положении аминокислоты 19, Т в положении аминокислоты 22, К в положении аминокислоты 46, А в положении аминокислоты 47, S

в положении аминокислоты 64, Т в положении аминокислоты 78, S в положении аминокислоты 80, S в положении аминокислоты 81, L в положении аминокислоты 82, Q

в положении аминокислоты 83, F в положении аминокислоты 87 и/или Q в положении

20 аминокислоты 104.

Согласно второму аспекту настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL),

25 причем указанный домен VH содержит, по существу состоит или состоит из

аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 17

(QVQLVQSGX⁹E X¹¹KKPGASVKX²⁰SCKASGYSFT TFWMDWVX³⁸QA

PGQGLEWX⁴⁸GR IDPSDSESRL DQX⁶³FKDRX⁶⁸TX⁷⁰TVDKSTSTVY

MX⁸²LSSX⁸⁶X⁸⁷SED X⁹¹AVYYCARGN DGYYGFAIWG QGTLTVSS), где X⁹

30 представляет собой А или Р, X¹¹ представляет собой L или V, X²⁰ представляет собой I или V, X³⁸ представляет собой К или R, X⁴⁸ представляет собой I или M, X⁶³

представляет собой К или R, X⁶⁸ представляет собой А или V, X⁷⁰ представляет собой L или M, X⁸² представляет собой Е или Q, X⁸⁶ представляет собой L или Р, X⁸⁷

представляет собой R или Т и X⁹¹ представляет собой S или Т, или

аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 17, имеющей одну, две или три аминокислотные замены, при этом указанная аминокислотная последовательность, имеющая одну, две или три аминокислотные замены, содержит последовательности CDR1H, CDR2H, CDR3H из SEQ ID NO: 20-22, соответственно, и

5 причём указанный домен VL содержит, по существу состоит или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 18 (DIX³X⁴TQSPX⁹S LX¹²ASVGDRVITCKASQSVD YDGDSYMKWY QQKPGKAPKL LIYAASNLS GX⁶²PSRFSGSG SGTDFLTIS SLQX⁸⁴EDFATY YCQQSNEDPY TFGQGKLEI K), где X³ представляет собой V или Q, X⁴ представляет собой L или M, X⁹ представляет собой A или S, X¹² представляет собой A или S, X⁶² представляет собой I или V и X⁸⁴ представляет собой E или P, или

10 аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 18, имеющей одну, две, три, четыре, пять, шесть или семь аминокислотных замен, при этом указанная аминокислотная последовательность, имеющая одну, две, три, четыре, пять, 15 шесть или семь аминокислотных замен, содержит последовательности CDR1L, CDR2L, CDR3L из SEQ ID NO: 23-25, соответственно.

Согласно третьему аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей:

20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с первым аспектом или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии со вторым аспектом; и

дополнительно содержащей один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей, вспомогательных веществ, наполнителей, связывающих 25 агентов, смазывающих агентов, веществ, способствующих скольжению, разрыхлителей, адсорбентов и/или консервантов.

Согласно четвертому аспекту настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту в соответствии с первым аспектом или антителу 30 или его антигенсвязывающему фрагменту в соответствии со вторым аспектом для применения в медицине.

Согласно пятому аспекту настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту в соответствии с первым аспектом или антителу или

его антигенсвязывающему фрагменту в соответствии со вторым аспектом для применения в лечении или предотвращении заболевания или нарушения, в которое вовлечена патологическая активность C5a.

- 5 Приведенное краткое описание изобретения не обязательно описывает все признаки настоящего изобретения. Другие варианты реализации станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

- 10 **Фигура 1.** Связывание клонов IFX с rhC5a в различных концентрациях сопоставимым дозозависимым образом. Исходная молекула IFX-1 была помечена как VN0Vk0.
- Фигура 2.** Построение графика гемолиза образца (%) и коэффициента разведения в плазме (кратность) для расчета CH50. Исходная молекула IFX-1 была помечена как VN0Vk0.
- 15 **Фигура 3.** Индуцированная анафилатоксином rhC5a положительная регуляция CD11b и его индивидуальная блокада 12 клонами IFX-2 при молярном соотношении Ag:Ab 1:1 по сравнению с IFX-1 (тест AB-IgG4-004).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

20 **Определения**

- Прежде чем настоящее изобретение будет подробно описано ниже, следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами и реагентами, описанными в настоящем документе, поскольку они могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем описании
- 25 терминология предназначена только для описания конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют те же значения, которые обычно понимаются специалистом в области техники, к которой
- 30 относится данное изобретение.

 Предпочтительно термины, используемые в настоящем описании, определены, как описано в глоссарии «A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)», Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. and Kölbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010, Basel, Switzerland).

Во всем описании настоящего изобретения, включая следующую за ним формулу изобретения, если из контекста не следует иное, слово «включать» («содержать») и варианты, такие как «включает» («содержит») и «включающий» («содержащий»), подразумевают включение указанного целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий.

В тексте настоящего описания цитируется несколько документов (например, патенты, заявки на патенты, научные публикации, описания производителя, инструкции, представленные последовательности базы генетических данных (англ. GenBank Accession Number) и т. д.). Ничто в настоящем описании не должно быть истолковано как признание того, что изобретение не имеет права предшествовать такому описанию в силу предшествующего изобретения. Некоторые из документов, цитируемых в настоящем описании, характеризуются как *«включенные посредством ссылки»*. В случае противоречия между определениями или положениями таких включенных ссылок и определениями или положениями, приведенными в настоящем описании, приоритет имеет текст настоящего описания.

Последовательности: Все последовательности, упомянутые в настоящем описании, раскрыты в прилагаемом перечне последовательностей, который со всем своим содержанием и раскрытием является частью этого описания.

В настоящей заявке термин «C5a человека» относится к 74 аминокислотному пептиду ниже:

TLQKKIEEIA AKYKHSVVKK CCYDGACVNN DETCEQRAAR ISLGPRCIKA
ftccvvasq Iranishkdm qlgr (SEQ ID NO: 1).

Аминокислотная последовательность C5 человека может быть найдена под номером доступа UniProtKB P01031 (CO5_HUMAN). В настоящей заявке термины «C5a человека» и «hC5a» используются взаимозаменяемо.

В настоящем документе первое соединение (например, антитело), как полагают, «связывается» со вторым соединением (например, антигеном, таким как белок-мишень), если оно имеет константу диссоциации K_d в отношении указанного второго соединения 1 мкМ или менее, предпочтительно 900 нМ или менее, более предпочтительно 800 нМ или менее, более предпочтительно 700 нМ или менее, более предпочтительно 600 нМ или менее, более предпочтительно 500 нМ или менее, более предпочтительно 400 нМ или менее, более предпочтительно 300 нМ или менее, более предпочтительно 200 нМ

или менее, еще более предпочтительно 100 нМ или менее, еще более предпочтительно 90 нМ или менее, еще более предпочтительно 80 нМ или менее, еще более предпочтительно 70 нМ или менее, еще более предпочтительно 60 нМ или менее, еще более предпочтительно 50 нМ или менее, еще более предпочтительно 40 нМ или менее, еще более предпочтительно 30 нМ или менее, еще более предпочтительно 20 нМ или менее, еще более предпочтительно 10 нМ или менее, еще более предпочтительно 5 нМ или менее, еще более предпочтительно 4 нМ или менее, еще более предпочтительно 3 нМ или менее, еще более предпочтительно 2 нМ или менее и еще более предпочтительно 1 нМ или менее.

Термин «связывание» согласно настоящему изобретению предпочтительно относится к специфичному связыванию. Термин «специфичное связывание» означает, что связывающая молекула (например, антитело) связывается прочнее с мишенью, такой как эпитоп, в отношении которой она специфична, по сравнению со связыванием с другой мишенью. Связывающая молекула связывается сильнее с первой мишенью по сравнению со второй мишенью, если она связывается с первой мишенью с константой диссоциации (K_d), которая ниже константы диссоциации для второй мишени. Предпочтительно константа диссоциации (K_d) для мишени, с которой связывающая молекула специфично связывается, более чем в 10 раз, предпочтительно более чем в 20 раз, более предпочтительно более чем в 50 раз, еще более предпочтительно более чем в 100 раз, 200 раз, 500 раз или 1000 раз ниже константы диссоциации (K_d) для мишени, с которой связывающая молекула не связывается специфично.

В настоящей заявке термин « K_d » (обычно измеряется в «моль/л», иногда сокращенно обозначается «М») предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия связывающего фрагмента (например, антитела или его фрагмента) и молекулы-мишени (например, антигена или его эпитопа).

Методы определения аффинности связывания соединений, то есть определения константы диссоциации K_d , известны специалисту в данной области техники и могут быть выбраны, например, из следующих методов, известных в данной области техники: технология поверхностного плазмонного резонанса (англ. Surface Plasmon Resonance, SPR), биослойная интерферометрия (англ. Bio-layer interferometry, BLI), иммуноферментный анализ (англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), проточная цитометрия, изотермическая титрационная калориметрия (англ. isothermal titration calorimetry, ИТК), аналитическое ультрацентрифугирование, радиоиммуноанализ (англ. Radioimmunoassay, RIA или IRMA) и усиленная хемилюминесценция (англ.

enhanced chemiluminescence, ECL). Как правило, константа диссоциации K_d определяется при 20°C, 25°C, 30°C или 37°C. Если специально не указано иное, значения K_d , приведенные в данном описании, определяют при 20°C с помощью SPR.

«Эпитоп», также известный как антигенная детерминанта, является частью
5 макромолекулы, которая распознается иммунной системой, в частности, антителами, В-клетками или Т-клетками. В настоящей заявке «эпитоп» представляет собой часть макромолекулы, способную связываться с соединением (например, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом), описанным в настоящем документе. В этом контексте термин «связывание» предпочтительно относится к специфичному
10 связыванию. Эпитопы обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как боковые цепи аминокислот или сахаров, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы можно различать на основании того факта, что связывание с первым вариантом, но не
15 последним вариантом теряется в присутствии денатурирующих растворителей.

В настоящей заявке термин «конформационный эпитоп» относится к эпитопу линейной макромолекулы (например, полипептида), который образован трехмерной структурой указанной макромолекулы. Применительно к настоящей заявке «конформационный эпитоп» представляет собой «прерывистый эпитоп», то есть
20 конформационный эпитоп на макромолекуле (например, на полипептиде), который образуется из по меньшей мере двух отдельных участков в первичной последовательности макромолекулы (например, аминокислотной последовательности полипептида). Другими словами, эпитоп считается «конформационным эпитопом», применительно к настоящему изобретению, если эпитоп состоит из по меньшей мере
25 двух отдельных участков в первичной последовательности, с которыми антитело согласно настоящему изобретению (или его антигенсвязывающий фрагмент) связывается одновременно, причем указанные по меньшей мере два отдельных участка прерваны одним или более участками в первичной последовательности, с которыми антитело согласно настоящему изобретению (или его антигенсвязывающий фрагмент)
30 не связывается. Предпочтительно такой «конформационный эпитоп» присутствует на полипептиде, и два отдельных участка в первичной последовательности представляют собой две отдельные аминокислотные последовательности, с которыми связывается антитело согласно настоящему изобретению (или его антигенсвязывающий фрагмент), причем указанные по меньшей мере две отдельные аминокислотные последовательности

прерваны одной или более аминокислотными последовательностями в первичной последовательности, с которыми антитело согласно настоящему изобретению (или его антигенсвязывающий фрагмент) не связывается. Предпочтительно прерывающая аминокислотная последовательность представляет собой непрерывную

5 аминокислотную последовательность, содержащую две или более аминокислот, с которыми антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент) не связывается. По меньшей мере две отдельные аминокислотные последовательности, с которыми связывается антитело согласно настоящему изобретению (или его антигенсвязывающий фрагмент), не имеют конкретных ограничений в отношении их длины. Такая отдельная

10 аминокислотная последовательность может состоять только из одной аминокислоты до тех пор, пока общее число аминокислот в указанных по меньшей мере двух отдельных аминокислотных последовательностях достаточно велико для осуществления специфичного связывания между антителом (или его антигенсвязывающим фрагментом) и конформационным эпитопом.

15 «Паратоп» является частью антитела, которая связывается с эпитопом. Применительно к настоящему изобретению «паратоп» является частью антитела к C5a (или его антигенсвязывающего фрагмента), описанного в настоящем документе, который связывается с эпитопом.

Термин «антитело» обычно относится к гликопротеину, содержащему по

20 меньшей мере две тяжелые цепи (H) и две легкие цепи (L), связанные между собой дисульфидными связями, или их антигенсвязывающую часть. Термин «антитело» также включает все рекомбинантные формы антител, в частности антител, описанных в настоящем документе, например, антитела, экспрессируемые в прокариотах, негликозилированные антитела, антитела, экспрессируемые в эукариотах (например,

25 клетках линии CHO), гликозилированные антитела и любые фрагменты и производные антигенсвязывающих антител, как описано ниже. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем описании как V_H или V_H) и константной области тяжелой цепи. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно обозначенной здесь как V_L или V_L) и

30 константной области легкой цепи. Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (от англ. complementarity determining regions, CDR), перемежающимися с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (от англ. framework regions, FR). Каждая V_H и V_L

состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела (или просто «связывающая часть») в настоящем описании означает один или несколько фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, которые включены в термин «антигенсвязывающая часть» антитела, включают (i) фрагменты Fab, моновалентные фрагменты, состоящие из доменов VL, VH, CL и CH; (ii) фрагменты F(ab')₂, двухвалентные фрагменты, содержащие два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагменты Fd, состоящие из доменов VH и CH1; (iv) фрагменты Fv, состоящие из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагменты dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), которые состоят из домена VH; (vi) выделенные участки, определяющие комплементарность (CDR), и (vii) комбинации двух или более выделенных CDR, которые необязательно могут быть соединены синтетическим линкером. Кроме того, несмотря на то, что два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с использованием рекомбинантных способов синтетическим линкером, который позволяет получить их в виде одной белковой цепи, в которой области VL и VH спариваются с образованием моновалентных молекул (известных 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). Такие одноцепочечные антитела также предназначены для включения в термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела. Следующим примером является слитый белок связывающего домена иммуноглобулина, содержащий (i) полипептид связывающего домена, который слит с полипептидом шарнирной области иммуноглобулина, (ii) константную область CH2 тяжелой цепи иммуноглобулина, слитую с шарнирной областью, и (iii) константную область CH3 тяжелой цепи иммуноглобулина, слитую с константной областью CH2. Полипептид связывающего домена может быть вариабельной областью тяжелой цепи или

5 вариабельной областью легкой цепи. Слитые белки связывающего домена
 иммуноглобулина дополнительно раскрыты в US 2003/0118592 и US 2003/0133939. Эти
 фрагменты антител получают с использованием обычных методик, известных
 специалистам в данной области техники, и фрагменты подвергают скринингу на
 10 пригодность таким же образом, как и интактные антитела. Другими примерами
 «антигенсвязывающих фрагментов» являются так называемые микроантитела, которые
 получены из отдельных CDR. Например, Hear et al., 2005, описали микроантитело из 17
 аминокислотных остатков, полученное из CDR3 тяжелой цепи антитела, направленного
 против гликопротеина оболочки gp120 ВИЧ-1 (Hear C.J. et al. (2005) *Analysis of a 17-
 10 amino acid residue, virus-neutralizing microantibody*. J. Gen. Virol. 86:1791-1800). Другие
 примеры включают малые миметики антител, содержащие два или более участков CDR,
 которые слиты друг с другом, предпочтительно с помощью родственных каркасных
 участков. Такой малый миметик антитела, содержащий CDR1 V_H и CDR3 V_L, связанные
 когнатным FR2 V_H, был описан Qiu et al., 2007 (Qiu X.-Q. et al. (2007) *Small antibody
 15 mimetics comprising two complementary-determining regions and a framework region for
 tumor targeting*. Nature biotechnology 25(8):921-929).

Таким образом, термин «антитело или его антигенсвязывающий фрагмент» в
 контексте настоящего документа относится к молекулам иммуноглобулина и
 иммунологически активным частям молекул иммуноглобулина, то есть молекулам,
 20 которые содержат антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифично связывает
 антиген. В широком смысле термин «антитело или его антигенсвязывающий фрагмент»
 включает молекулы иммуноглобулина любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и
 IgY). Однако предпочтительные молекулы иммуноглобулина согласно настоящему
 изобретению относятся к типу IgG. В пределах типа IgG предпочтительные молекулы
 25 иммуноглобулина согласно настоящему изобретению могут быть из любого класса или
 подкласса (например, IgG1; IgG2, предпочтительно IgG2a и IgG2b; IgG3; или IgG4).

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, пригодные для применения в
 соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены из любого животного,
 включая птиц и млекопитающих. Таким образом, антитела или их фрагменты могут
 30 происходить от человека, шимпанзе, грызуна (например, мыши, крысы, морской свинки
 или кролика), курицы, индейки, свиньи, овцы, козы, верблюда, коровы, лошади, осла,
 кошки или собаки. Для многих применений особенно предпочтительно, чтобы антитела
 имели человеческое или мышинное происхождение. Антитела, подходящие для
 применения в настоящем изобретении, включают химерные молекулы, в которых

константная область антитела, полученная из одного вида, например, человека, объединена с антигенсвязывающим сайтом, полученным из другого вида, например, мыши. В наиболее предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения антитела и их антигенсвязывающие фрагменты включают гуманизированные молекулы, в которых антигенсвязывающие сайты антитела, полученные от нечеловеческого вида (например, от мыши), объединены с константными и каркасными областями человеческого происхождения.

В качестве примера, антитела согласно настоящему изобретению могут быть получены непосредственно из гибридом, которые экспрессируют антитело, или могут быть клонированы и рекомбинантно экспрессированы в клетке-хозяине (например, клетке СНО или лимфоцитарной клетке). Дополнительными примерами клеток-хозяев являются микроорганизмы, такие как *E.coli*, и грибы, такие как дрожжи. В качестве альтернативы они могут быть получены рекомбинантно из трансгенного животного, не являющегося человеком, или растения.

Термин «химерное антитело» относится к тем антителам, в которых одна часть каждой из аминокислотных последовательностей тяжелых и легких цепей гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из определенного вида или принадлежащих к определенному классу, тогда как оставшийся сегмент цепи гомологичен соответствующим последовательностям другого вида или класса. Как правило, переменная область легкой и тяжелой цепей имитирует переменные области антител, полученных из одного вида млекопитающих, тогда как константные части гомологичны последовательностям антител, полученных из другого вида. Одним из очевидных преимуществ таких химерных форм является то, что переменная область может быть удобно получена из известных в настоящее время источников с использованием легкодоступных В-клеток или гибридом из организмов-хозяев, отличных от человека, в комбинации с константными областями, полученными из, например, препаратов клеток человека. В то время как переменная область имеет преимущество в простоте получения, и источник не влияет на специфичность, константная область, являющаяся человеческой, с меньшей вероятностью вызывает иммунный ответ от человека, когда вводятся антитела, чем константная область от нечеловеческого источника. Однако определение не ограничивается этим конкретным примером.

Термин «гуманизированное антитело» относится к молекуле, имеющей антигенсвязывающий сайт, который в основном происходит от иммуноглобулина из

нечеловеческого вида, при этом остальная часть структуры молекулы иммуноглобулина основана на структуре и/или последовательности иммуноглобулина человека. Антигенсвязывающий сайт может содержать либо полные переменные домены, слитые с константными доменами, либо только области, определяющие комплементарность (CDR), привитые на соответствующие каркасные области в переменных доменах. Антигенсвязывающие сайты могут быть дикого типа или модифицированы одной или несколькими аминокислотными заменами, например, модифицированный, чтобы больше походить на человеческие иммуноглобулины. Некоторые формы гуманизированных антител сохраняют все последовательности CDR (например, гуманизированное антитело мыши, которое содержит все шесть CDR из антитела мыши). Другие формы имеют одну или несколько CDR, которые изменены относительно исходного антитела.

Специалистам в данной области известны различные способы гуманизации антител, которые были рассмотрены Almagro и Fransson, в 2008 году, *Frontiers in Bioscience*, 13: 1619-1633, содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки. Обзорная статья Almagro и Fransson кратко изложена в национальной заявке US 2012/0231008 A1 международной заявки WO 2011/063980 A1. Содержание US 2012/0231008 A1 и WO 2011/063980 A1 полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

Термин «антитела человека» в настоящем описании означает антитела, имеющие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека согласно настоящему изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфичного мутагенеза в условиях *in vitro* или путем соматической мутации в условиях *in vivo*). Антитела человека согласно настоящему изобретению включают антитела, выделенные из библиотек иммуноглобулинов человека или из животных, трансгенных по одному или более иммуноглобулинам человека и не экспрессирующих эндогенные иммуноглобулины, как описано, например, Kucherlapati & Jakobovits в патенте США №5939598.

В настоящей заявке термин «моноклональное антитело» относится к препарату антител, имеющих аналогичный молекулярный состав. Моноклональное антитело демонстрирует единственную специфичность связывания и аффинность в отношении конкретного эпитопа. Как правило, моноклональные антитела продуцируются

гибридомой, которая включает В-клетку, полученную от нечеловеческого животного, например, мыши, слитую с иммортализованной клеткой.

Термин «рекомбинантное антитело» в контексте настоящего документа включает все антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, например, (a) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным в отношении генов иммуноглобулинов, или гибридомы, полученной из указанного животного, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например, из трансфектомы, (c) антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов с другими последовательностями ДНК.

Термин «трансфектома» в настоящем описании включает рекомбинантные эукариотические клетки-хозяева, экспрессирующие антитело, такие как клетки CHO, клетки NS/0, клетки НЕК293, клетки НЕК293Т, клетки растений или грибов, включая клетки дрожжей.

Термин «гетерологичное антитело» в настоящем описании означает трансгенный организм, продуцирующий такое антитело. Данный термин относится к антителу, содержащему аминокислотную последовательность или кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую последовательности, обнаруженной в организме, не являющемся трансгенным организмом, и, как правило, происходящем из вида, отличного от трансгенного организма.

Термин «гетерогибридное антитело» в настоящем описании относится к антителу, содержащему легкие и тяжелые цепи различного происхождения. Например, антитело, имеющее тяжелую цепь человека, связанную с легкой цепью мыши, представляет собой гетерогибридное антитело.

Таким образом, «антитела и их антигенсвязывающие фрагменты» обычно включают, но не ограничиваются ими, поликлональные, моноклональные, одновалентные, биспецифичные, гетероконъюгированные, полиспецифичные, рекомбинантные, гетерологичные, гетерогибридные, химерные, гуманизированные (в частности, CDR-привитые), деиммунизированные антитела или антитела человека, фрагменты Fab, фрагменты Fab', фрагменты F(ab')₂, фрагменты, полученные с помощью библиотеки экспрессии Fab, Fd, Fv, связанные дисульфидными связями Fv (dsFv), одноцепочечные антитела (например, scFv), диатела или тетратела (Holliger P. et al.

(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90(14), 6444-6448), нанотела (также известные как однодоменные антитела), антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, антиидиотипические антитела к антителам согласно настоящему изобретению), а также эпитопсвязывающие фрагменты любого из указанных выше.

5 Антитела, описанные в настоящем документе, предпочтительно являются выделенными. «Выделенное антитело» в контексте настоящего документа относится к антителу, которое по существу не содержит других антител, обладающих другими видами антигенной специфичности; например, выделенное антитело, которое специфично связывается с C5a, по существу не содержит антител, которые специфично
10 связываются с антигенами, отличными от C5a. Однако выделенное антитело, которое специфично связывается с эпитопом, изоформой или вариантом C5a человека, может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, из других видов (например, гомологи C5a у другого вида, например, C5a крысы). Кроме того, выделенное антитело может по существу не содержать другой клеточный материал
15 и/или химические вещества. В настоящем документе «комбинация выделенных антител» относится к антителам, имеющим различные виды специфичности и комбинированным в строго определенной композиции.

Термин «встречающийся в природе» в контексте настоящего документа означает объект, который можно найти в природе. Например, полипептидная или
20 полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из источника в природе и которая не была преднамеренно изменена человеком в лаборатории, представляет собой встречающуюся в природе последовательность.

«Консервативные замены» могут быть сделаны, например, на основе сходства
25 полярности, заряда, размера, растворимости, гидрофобности, гидрофильности и/или амфипатической природы вовлеченных остатков аминокислот. Аминокислоты могут быть сгруппированы в следующие шесть стандартных групп аминокислот:

- (1) гидрофобные: Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 30 (3) кислотные: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro; и
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

В настоящей заявке «консервативные замены» определены как замены аминокислоты другой аминокислотой, перечисленной в той же самой группе из шести стандартных групп аминокислот, приведенных выше. Например, обмен Asp на Glu сохраняет один отрицательный заряд в полипептиде, модифицированном таким способом. Помимо этого глицин и пролин могут быть заменены друг другом в зависимости от их способности нарушать структуру альфа-спиралей. Некоторые предпочтительные консервативные замены в пределах вышеуказанных шести групп представляют собой замены в следующих подгруппах: (i) Ala, Val, Leu и Ile; (ii) Ser и Thr; (ii) Asn и Gln; (iv) Lys и Arg; и (v) Tyr и Phe. С учетом известного генетического кода, а также методик получения рекомбинантных и синтетических ДНК, специалист может легко сконструировать ДНК, кодирующие консервативные варианты аминокислот.

В настоящей заявке «неконсервативные замены» или «неконсервативные обмены аминокислот» определены как обмены одной аминокислоты на другую аминокислоту, перечисленную в другой группе из шести стандартных групп аминокислот с (1) по (6), приведенных выше.

Сходство нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, т.е. процент идентичности последовательностей, можно определить с помощью выравнивания последовательностей. Такие выравнивания могут быть выполнены с помощью нескольких алгоритмов, известных в данной области техники, предпочтительно с помощью математического алгоритма Karlin and Altschul (Karlin & Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877), hmalign (пакет HMMER) или алгоритма CLUSTAL (Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-80) или алгоритма CLUSTALW2 (Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948).

Степень идентичности последовательностей (совпадение последовательностей) может быть рассчитана с использованием, например, BLAST, BLAT или BlastZ (или BlastX). Сходный алгоритм включен в программы BLASTN и BLASTP Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410. Поиски белка BLAST выполняют с помощью программы BLASTP, доступной, например, на веб-сайте:

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome

Предпочтительными используемыми параметрами алгоритма являются параметры по умолчанию, установленные на указанном веб-сайте:

Ожидаемый порог = 10, размер слова = 3, максимальное количество совпадений в диапазоне запроса = 0, матрица = BLOSUM62, штраф за пробел = наличие: 11
 Расширение: 1, композиционные корректировки = условная композиционная корректировка оценочной матрицы вместе с базой данных неизбыточных белковых последовательностей (nr).

Чтобы получить выравнивания с пропусками для целей сравнения, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST используются параметры по умолчанию соответствующих программ. Анализ совпадения последовательностей может быть дополнен установленными методиками картирования гомологии, такими как Shuffle-LAGAN (Brudno M., Bioinformatics 2003b, 19 Suppl 1:I54-I62) или Марковские случайные поля.

Когда в настоящей заявке упоминаются проценты идентичности последовательностей, эти проценты рассчитывают относительно полной длины указанной референсной последовательности, если специально не указано иное. Например, утверждение «*аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: XYZ*» означает, что процент идентичности последовательностей рассчитывают в отношении общей длины SEQ ID NO: XYZ.

Термин «биологическая активность» в контексте настоящего документа относится к любому виду активности, который может проявлять полипептид, включая, но не ограничиваясь ими: ферментативную активность; активность связывания с другим соединением (например, связывание с другим полипептидом, в частности, связывание с рецептором, или связывание с нуклеиновой кислотой); ингибиторную активность (например, активность, направленную на ингибирование фермента); активирующую активность (например, активность, направленную на активацию фермента); или токсическое действие. В отношении вариантов и производных полипептида, вариант или производное не обязательно должно проявлять указанный вид активности в степени, аналогичной таковой для исходного полипептида. Вариант рассматривают как вариант, применительно к настоящей заявке, если он обладает соответствующей активностью, величина которой составляет по меньшей мере 10% (например, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50%) от активности исходного полипептида. Аналогичным образом, производное рассматривают как производное, применительно к настоящей заявке, если оно обладает значимой

биологической активностью, величина которой составляет по меньшей мере 10% от активности исходного полипептида. Особенно значимая «биологическая активность», применительно к настоящему изобретению, представляет собой активность связывания с конформационным эпитопом C5a человека, образованным аминокислотными последовательностями NDETCEQRA (SEQ ID NO: 2) и SHKDMQL (SEQ ID NO: 3). Предпочтительно значимая «биологическая активность», применительно к настоящему изобретению, представляет собой активность связывания с конформационным эпитопом C5a человека, образованным аминокислотными последовательностями DETCEQR (SEQ ID NO: 4) и HKDMQ (SEQ ID NO: 5). Еще более предпочтительно значимая «биологическая активность», применительно к настоящему изобретению, представляет собой активность связывания с конформационным эпитопом C5a человека, образованным аминокислотными последовательностями, DETCEQR (SEQ ID NO: 4) и KDM. Анализы для определения активности связывания известны специалисту в данной области техники и включают анализы методами твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) и поверхностного плазмонного резонанса.

В настоящем документе «пациент» означает любое млекопитающее или птицу, которые могут получить пользу от лечения антителом к C5a, описанным в настоящем документе. Предпочтительно «пациент» выбран из группы, состоящей из лабораторных животных (например, мыши или крысы), домашних животных (включая, например, морскую свинку, кролика, курицу, индейку, свинью, овцу, козу, верблюда, корову, лошадь, осла, кошку или собаку), или приматов, включая обезьян (например, африканских зеленых мартишек, шимпанзе, бонобо, горилл) и человека. Особенно предпочтительно «пациент» представляет собой человека. Термины «пациент» и «субъект, подлежащий лечению» (или кратко: «субъект») используются в настоящем документе как взаимозаменяемые.

В настоящем документе термин «лечить», «осуществление лечения» или «лечение» заболевания или расстройства означает выполнение одного или более из следующих действий: (a) снижение степени тяжести и/или продолжительности заболевания; (b) ограничение или предотвращение развития симптомов, характерных для расстройств(a), подлежащих лечению; (c) ингибирование ухудшения симптомов, характерных для расстройств(a), которые лечат; (d) ограничение или предотвращение рецидивов расстройств(a) у пациентов, которые ранее имели расстройство(a); и (e) ограничение или предотвращение рецидива симптомов у пациентов, которые ранее имели симптомы расстройств(a).

В настоящей заявке термин «предотвращать», «предотвращающий», «предотвращение» или «профилактика» заболевания или расстройства означает предотвращение возникновения расстройства у субъекта в течение определенного промежутка времени. Например, если антитело согласно настоящему изобретению (или его антигенсвязывающий фрагмент) вводят субъекту для предотвращения заболевания или нарушения, развитие указанного заболевания или нарушения предотвращается по меньшей мере на день введения и предпочтительно также на один или более дней (например, на от 1 до 30 дней; или от 2 до 28 дней; или от 3 до 21 дня; или от 4 до 14 дней; или от 5 до 10 дней) после дня введения.

В настоящем документе «введение» включает введение *in vivo*, а также введение непосредственно в ткань *ex vivo*, например, с помощью венозных шунтов.

«Фармацевтическая композиция» в соответствии с настоящим изобретением может быть представлена в виде композиции, в которой различные активные ингредиенты и разбавители и/или носители смешаны, или может принимать форму комбинированного препарата, в котором активные ингредиенты присутствуют в частично или полностью дискретной форме. Примером такой комбинации или комбинированного препарата является составной набор.

Термин «эффективное количество» означает количество терапевтического агента, достаточное для достижения поставленной цели. Эффективное количество конкретного терапевтического агента будет варьироваться в зависимости от таких факторов как характер агента, путь введения, размер и вид субъекта, который получит терапевтический агент, и цель введения. Эффективное количество в каждом отдельном случае может быть определено эмпирически опытным специалистом в соответствии с установленными в данной области способами.

Если в контексте не указано иное, термин «активный агент» относится к антителам согласно настоящему изобретению и к антигенсвязывающим фрагментам согласно настоящему изобретению. В настоящем документе термины «активный агент» и «терапевтический агент» используются взаимозаменяемо.

В настоящем документе термин «дополнительная терапия» относится к комбинированной терапии, при которой пациенту вводят по меньшей мере два различных лекарственных средства. Указанные по меньшей мере два различных лекарственных препарата могут быть изготовлены в виде одной фармацевтической композиции, содержащей оба лекарственных препарата. В качестве альтернативы, каждое лекарственное средство может быть изготовлено в виде отдельной

фармацевтической композиции, и фармацевтические композиции вводят пациенту по отдельности (например, в различных временных точках и/или различными путями введения). В последнем варианте (по меньшей мере) два различных лекарственных средства могут быть обеспечены в виде составного набора.

5 «Фармацевтически приемлемый» означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или перечисленный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и более конкретно у человека.

В настоящей заявке термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту, вспомогательному веществу или носителю, с которым вводят терапевтический агент. Подходящие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как солевые растворы в воде и маслах, включая те, которые получены из нефти или имеют животное, растительное или синтетическое происхождение, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобное. Солевой раствор является предпочтительным носителем, если фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно применять в качестве жидких носителей, в частности, для растворов для инъекций. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рисовую муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Композиция, при необходимости, также может содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или pH-буферизующих агентов. Подходящие композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, препаратов с замедленным высвобождением и т.п. Композиция может быть изготовлена в виде суппозитория с традиционными связующими веществами и носителями, такими как триглицериды. Соединения согласно настоящему изобретению могут быть изготовлены в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные со свободными аминокруппами, такие как соли, полученные с соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислотами и т.д., и соли, образованные со свободными карбоксильными группами, такие как соли, полученные с натрием, калием, аммонием, кальцием, гидроксидами железа, изопропиламином, триэтиламином, 2-этиламиноэтанолом, гистидином, прокаином и т.д. Примеры подходящих

фармацевтических носителей описаны в «Remington: The Science and Practice of Pharmacy» 22nd edition, Loyd V. Allen Jr. et al. (eds.), Pharmaceutical Press, 2012. Подходящие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество соединения, предпочтительно в очищенной форме, совместно с подходящим количеством носителя, чтобы обеспечить форму для надлежащего введения пациенту. Состав должен соответствовать способу введения.

Общеизвестные и используемые способы в области молекулярной биологии, методики в области клеточной биологии, химии белков и антител полностью описаны в постоянно обновляемых изданиях «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», (Sambrook et al., Cold Spring Harbor); «Current Protocols in Molecular Biology» (F. M. Ausubel et al. Eds., Wiley & Sons); «Current Protocols in Protein Science» (J. E. Colligan et al. eds., Wiley & Sons); «Current Protocols in Cell Biology» (J. S. Bonifacino et al., Wiley & Sons) и «Current Protocols in Immunology» (J. E. Colligan et al., Eds., Wiley & Sons). Известные методики, относящиеся к культуре клеток и культуральным средам, описаны в “Large Scale Mammalian Cell Culture (D. Hu et al., Curr. Opin. Biotechnol. 8:148-153, 1997); “Serum free Media” (K. Kitano, Biotechnol. 17:73-106, 1991); и “Suspension Culture of Mammalian Cells” (J.R. Birch et al. Bioprocess Technol. 10:251-270, 1990).

Варианты реализации изобретения

Далее настоящее изобретение будет дополнительно описано. В следующих утверждениях различные аспекты настоящего изобретения определены более подробно. Каждый аспект, определенный ниже, может быть объединен с любым другим аспектом или аспектами, если явно не указано иное. В частности, любой признак, указанный как предпочтительный или выгодный, может быть объединен с любым другим признаком или признаками, указанными как предпочтительные или выгодные.

Согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), причем указанный домен VH содержит, по существу состоит или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 10 (QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT TFWMDWVRQA PGQGLEWIGR

IDPSDSESRL DQRFKDRVMT TVDKSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARGN
DGYYGFAFWG QGTLVTVSS, VH4) или

аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности (предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или наиболее предпочтительно по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 10, при этом указанная аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 80% (по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, содержит последовательности CDR1H, CDR2H и CDR3H из SEQ ID NO: 20-22, соответственно, и при этом указанная аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 80% (по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, содержит V в положении аминокислоты 5, E в положении аминокислоты 10, K в положении аминокислоты 12, K в положении аминокислоты 13, A в положении аминокислоты 16, A в положении аминокислоты 40 и/или T в положении аминокислоты 76, и

причем указанный домен VL содержит, по существу состоит или состоит из

аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 16 (DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQSVD YDGDSYMKWY QQKPGKAPKL LIYAASNLSQ GVPSRFGSG SGTDFLTIS SLQPEDFATY YCQQSNEDPY TFGQGKLEIK, V_K4) или

аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности (предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или наиболее предпочтительно по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 16, при этом указанная аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 80% (по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентичности

последовательности с SEQ ID NO: 16, содержит последовательности CDR1L, CDR2L, CDR3L из SEQ ID NO: 23-25, соответственно, и при этом указанная аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 80% (по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16, содержит А в положении аминокислоты 13, V в положении аминокислоты 15, D в положении аминокислоты 17, V в положении аминокислоты 19, Т в положении аминокислоты 22, К в положении аминокислоты 46, А в положении аминокислоты 47, S в положении аминокислоты 64, Т в положении аминокислоты 78, S в положении аминокислоты 80, S в положении аминокислоты 81, L в положении аминокислоты 82, Q в положении аминокислоты 83, F в положении аминокислоты 87 и/или Q в положении аминокислоты 104.

В предпочтительном варианте реализации первого аспекта аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 80% (предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или наиболее предпочтительно по меньшей мере 99%) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, содержит по меньшей мере четыре (предпочтительно по меньшей мере 5, более предпочтительно по меньшей мере 6, наиболее предпочтительно 7) из следующих семи аминокислот в указанных положениях:

- V в положении аминокислоты 5,
- E в положении аминокислоты 10,
- K в положении аминокислоты 12,
- K в положении аминокислоты 13,
- A в положении аминокислоты 16,
- A в положении аминокислоты 40, или
- T в положении аминокислоты 76.

В предпочтительном варианте реализации первого аспекта аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 80% (предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, еще более предпочтительно по меньшей мере

98% или наиболее предпочтительно по меньшей мере 99%) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16, содержит по меньшей мере восемь (предпочтительно по меньшей мере 9, более предпочтительно по меньшей мере 10, более предпочтительно по меньшей мере 11, еще более предпочтительно по меньшей мере 12, еще более предпочтительно по меньшей мере 13, еще более предпочтительно по меньшей мере 14, наиболее предпочтительно 15) из следующих пятнадцати аминокислот в указанных положениях:

- A в положении аминокислоты 13,
- V в положении аминокислоты 15,
- 10 - D в положении аминокислоты 17,
- V в положении аминокислоты 19,
- T в положении аминокислоты 22,
- K в положении аминокислоты 46,
- A в положении аминокислоты 47,
- 15 - S в положении аминокислоты 64,
- T в положении аминокислоты 78,
- S в положении аминокислоты 80,
- S в положении аминокислоты 81,
- L в положении аминокислоты 82,
- 20 - Q в положении аминокислоты 83,
- F в положении аминокислоты 87, или
- Q в положении аминокислоты 104.

В предпочтительном варианте реализации первого аспекта аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 80% (предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или наиболее предпочтительно по меньшей мере 99%) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, содержит по меньшей мере четыре (предпочтительно по меньшей мере 5, более предпочтительно по меньшей мере 6, наиболее предпочтительно 7) из следующих семи аминокислот в указанных положениях:

- V в положении аминокислоты 5,
- E в положении аминокислоты 10,

- К в положении аминокислоты 12,
- К в положении аминокислоты 13,
- А в положении аминокислоты 16,
- А в положении аминокислоты 40, или

5 - Т в положении аминокислоты 76;

и необязательно содержит 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативные замены, расположенные в положениях аминокислот 1-4 или 6-9 из SEQ ID NO: 10;

и

10 аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 80% (предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или наиболее предпочтительно по меньшей мере 99%) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16, содержит по меньшей мере восемь (предпочтительно по меньшей мере 9, более предпочтительно по меньшей мере 10, более предпочтительно по меньшей мере 11, еще более предпочтительно по меньшей мере 12, еще более предпочтительно по меньшей мере 13, еще более предпочтительно по меньшей мере 14, наиболее предпочтительно 15) из следующих

15 пятнадцати аминокислот в указанных положениях:

20

- А в положении аминокислоты 13,
- V в положении аминокислоты 15,
- D в положении аминокислоты 17,
- V в положении аминокислоты 19,
- Т в положении аминокислоты 22,
- К в положении аминокислоты 46,
- А в положении аминокислоты 47,
- S в положении аминокислоты 64,
- Т в положении аминокислоты 78,

25

30 - S в положении аминокислоты 80,

 - S в положении аминокислоты 81,

 - L в положении аминокислоты 82,

 - Q в положении аминокислоты 83,

- F в положении аминокислоты 87, или

- Q в положении аминокислоты 104;

и необязательно содержит 1, 2 или 3 аминокислотные замены, предпочтительно консервативные замены, расположенные в положениях аминокислот 1-10 из SEQ ID NO: 16.

5

Согласно второму аспекту настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL),

причем указанный домен VH содержит, по существу состоит или состоит из

10

аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 17

(QVQLVQSGX⁹E X¹¹KKPGASVKX²⁰ SCKASGYSFT TFWMDWVX³⁸QA

PGQGLEWX⁴⁸GR IDPSDSESRL DQX⁶³FKDRX⁶⁸TX⁷⁰ TVDKSTSTVY

MX⁸²LSSX⁸⁶X⁸⁷SED X⁹¹AVYYCARGN DGYYGFA YWG QGTLVTVSS), где X⁹

представляет собой A или P, X¹¹ представляет собой L или V, X²⁰ представляет собой I

15

или V, X³⁸ представляет собой K или R, X⁴⁸ представляет собой I или M, X⁶³

представляет собой K или R, X⁶⁸ представляет собой A или V, X⁷⁰ представляет собой L

или M, X⁸² представляет собой E или Q, X⁸⁶ представляет собой L или P, X⁸⁷

представляет собой R или T и X⁹¹ представляет собой S или T, или

аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 17, имеющей

20

одну, две или три аминокислотные замены, при этом указанная аминокислотная

последовательность, имеющая одну, две или три аминокислотные замены, содержит

последовательности CDR1H, CDR2H, CDR3H из SEQ ID NO: 20-22, соответственно, и

причем указанный домен VL содержит, по существу состоит или состоит из

аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 18

25

(DIX³X⁴TQSPX⁹S LX¹²ASVGDRVT ITCKASQSVD YDGD SYMKWY QQKPGKAPKL

LIYAASNLS GX⁶²PSRFGSGG SGTDFTLTIS SLQX⁸⁴EDFATY YCQQSNEDPY

TFGQG TKLEI K), где X³ представляет собой V или Q, X⁴ представляет собой L или M,

X⁹ представляет собой A или S, X¹² представляет собой A или S, X⁶² представляет

собой I или V и X⁸⁴ представляет собой E или P, или

30

аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 18, имеющей

одну, две, три, четыре, пять, шесть или семь аминокислотных замен, при этом

указанная аминокислотная последовательность, имеющая одну, две, три, четыре, пять,

шесть или семь аминокислотных замен, содержит последовательности CDR1L, CDR2L,

CDR3L из SEQ ID NO: 23-25, соответственно.

Согласно варианту реализации первого или второго аспекта домен VH содержит, по существу состоит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из VH1-VH5 (SEQ ID NO: 7-11); и/или домен VL содержит, по существу состоит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из Vκ1-Vκ4 (SEQ ID NO: 13-16).

Согласно варианту реализации первого или второго аспекта антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а) домен VH, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10 (VH4), и домен VL, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 16 (Vκ4), или

б) домен VH, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11 (VH5), и домен VL, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 15 (Vκ3).

Согласно варианту реализации первого или второго аспекта антитело представляет собой гуманизированное антитело.

Согласно варианту реализации первого или второго аспекта антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константный домен. Согласно некоторым вариантам реализации первого или второго аспекта константный домен содержит, по существу состоит или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 19 (константный домен IgG4 WT), причем указанная аминокислотная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 19 необязательно содержит одну или более из следующих аминокислотных замен:

- аминокислотную замену S108P;
- аминокислотные замены T130Q и M308L;
- аминокислотные замены M132Y, S134T и T136E.

Согласно варианту реализации первого или второго аспекта антигенсвязывающий фрагмент антитела выбран из группы, состоящей из фрагментов Fab, фрагментов Fab',

фрагментов F(ab')₂, фрагментов Fd, фрагментов Fv, связанных дисульфидными связями Fv (dsFv), однодоменных антител и одноцепочечных антител Fv (scFv).

Согласно одному варианту реализации первого или второго аспекта антитело или его антигенсвязывающий фрагмент проявляет одно или более из следующих свойств:

- указанное антитело или указанный его антигенсвязывающий фрагмент имеет константу связывания с C5a со значением K_d 10 нМ или менее (например, 9 нМ или менее; 8 нМ или менее, 7 нМ или менее, 6 нМ или менее, 5 нМ или менее, 4 нМ или менее, 3 нМ или менее или 2 нМ или менее);
- указанное антитело или указанный его антигенсвязывающий фрагмент проявляет по меньшей мере 75% блокирующую активность в отношении биологических эффектов, индуцированных одной молекулой C5a;
- указанное антитело или указанный его антигенсвязывающий фрагмент не ингибирует активность CH50 в плазме человека;
- указанное антитело или указанный его антигенсвязывающий фрагмент способен уменьшать продукцию IL-8, индуцированную *E. coli*, в цельной крови человека.
- указанное антитело или указанный его антигенсвязывающий фрагмент обладает сниженной иммуногенностью по сравнению с IFX-1.

Способ определения относительной иммуногенности показан в приведенных ниже примерах, т.е. скрининговый анализ на АЛС. Аббревиатура АЛС относится к антителам к декарственному средству.

Согласно варианту реализации первого или второго аспекта антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с конформационным эпитопом, образованным аминокислотными последовательностями NDETCEQRA (SEQ ID NO: 2) и SHKDMQL (SEQ ID NO: 3) C5a,

причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере одной аминокислотой в аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 2 и с по меньшей мере одной аминокислотой в аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 3.

Согласно дополнительному варианту реализации первого или второго аспекта антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с конформационным

эпитопом, образованным аминокислотными последовательностями DETCEQR (SEQ ID NO: 4) и HKDMQ (SEQ ID NO: 5) C5a,

причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере одной аминокислотой в аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 4 и с по меньшей мере одной аминокислотой в аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 5.

Согласно дополнительному варианту реализации первого или второго аспекта антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с конформационным эпитопом, образованным аминокислотными последовательностями DETCEQR (SEQ ID NO: 4) и KDM C5a,

причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере одной аминокислотой в аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 4 и с по меньшей мере одной аминокислотой в аминокислотной последовательности в соответствии с KDM.

Согласно третьему аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей:

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с первым аспектом или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии со вторым аспектом; и

дополнительно содержащей один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей, вспомогательных веществ, наполнителей, связывающих агентов, смазывающих агентов, веществ, способствующих скольжению, разрыхлителей, адсорбентов и/или консервантов.

Согласно четвертому аспекту настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту в соответствии с первым аспектом или антителу или его антигенсвязывающему фрагменту в соответствии со вторым аспектом для применения в медицине.

Согласно пятому аспекту настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту в соответствии с первым аспектом или антителу или его антигенсвязывающему фрагменту в соответствии со вторым аспектом для

применения в лечении или предотвращения заболевания или нарушения, в которое вовлечена патологическая активность C5a.

Согласно варианту реализации пятого аспекта заболевание или нарушение

5 выбрано из группы, состоящей из:

- аутоиммунных нарушений,
- воспалительных нарушений, аутовоспалительных нарушений или связанных с ними состояний,
- сердечно-сосудистых или цереброваскулярных нарушений,
- 10 - бактериальных или вирусных инфекций,
- нейродегенеративных нарушений или связанных с ними заболеваний, и
- разных видов рака или предраковых состояний.

Согласно некоторым вариантам реализации пятого аспекта вирусная инфекция представляет собой ВИЧ или СПИД.

15

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как получать и применять соединения, композиции и способы согласно настоящему изобретению, и не

20 предназначены для ограничения объема того, что авторы данного изобретения считают созданным ими изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых числовых параметров, но следует учитывать возможность появления некоторых ошибок и погрешностей эксперимента. Если не указано иное, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура указана в

25 градусах Цельсия, и давление равно или практически равно атмосферному.

Пример 1: Создание полностью гуманизированных антител к C5a (клонов IFX-2), полученных из IFX-1

30 В этом примере подробно описана работа, в которой последовательности гена V-области, кодирующие химерное антитело IFX-1 (VH0/Vκ0), использовали для конструирования ряда полностью гуманизированных антител с использованием технологии Composite Human Antibody™. Сконструированные гены варибельной области тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно, клонировали в векторы, кодирующие константный домен тяжелой цепи

IgG4 человека (см. SEQ ID NO: 19, но с аминокислотной заменой S108P) и константный домен легкой каппа-цепи человека. В других публикациях аминокислотную замену S108P иногда называют аминокислотной заменой S241P (с использованием нумерации Kabat полноразмерного человеческого IgG4). Химерные и гуманизированные антитела временно экспрессировали в клетках НЕК EBNA и очищали с использованием белка А.

МЕТОДЫ И РЕЗУЛЬТАТЫ

Дизайн последовательностей вариабельной области с использованием Composite

Human Antibody™

Структурные модели V-областей антитела IFX-1 получали с использованием Swiss PDB и анализировали с целью идентификации важных «ограничивающих» аминокислот в V-областях, которые, вероятно, будут существенными для связывающих свойств антитела. Большинство остатков, содержащихся в CDR вместе с рядом каркасных остатков, рассматривали как важные. Последовательности VH и Vκ IFX-1 содержат типичные каркасные остатки, и мотивы CDR 1, 2 и 3 сопоставимы со многими мышинными антителами.

На основании приведенного выше анализа полагали, что составные человеческие последовательности IFX-1 могут быть созданы с широкой свободой действия в отношении альтернативных остатков за пределами CDR, но только с небольшим выбором возможных остатков в последовательностях CDR.

Предварительный анализ показал, что соответствующие сегменты последовательности из нескольких антител человека могут быть объединены для создания CDR, сходных или идентичных таковым в мышинных последовательностях. Для областей за пределами CDR и фланкирующих их идентифицировали широкий набор сегментов последовательностей человека в качестве возможных компонентов новых гуманизированных V-областей.

Избегание эпитопа CD4+ Т-клеток

На основе структурного анализа большой предварительный набор сегментов последовательностей, которые могут быть использованы для создания гуманизированных вариантов IFX-1, отбирали и анализировали с использованием технологии iTope™ для *in silico* анализа связывания пептида с аллелями ГКГС класса II человека (Perry *et al* *New Approaches to Prediction of Immune Responses to Therapeutic Proteins during Preclinical Development* (2008). *Drugs R D* 9 (6): 385-396), и с

- использованием TCED™ известных Т-клеточных эпитопов, связанных с последовательностью антитела (Bryson *et al Prediction of Immunogenicity of Therapeutic Proteins* (2010). Biodrugs 24 (1):1-8). Отбрасывали сегменты последовательностей, которые были идентифицированы как значимые сегменты нечеловеческой
- 5 зародышевой линии, связывающиеся с ГКГС II класса человека, или которые, по оценкам, имели значительное количество попаданий против TCED™. Это привело к уменьшению набора сегментов, и их комбинации снова анализировали, как указано выше, чтобы убедиться, что соединения между сегментами не содержали
- 10 потенциальных Т-клеточных эпитопов. Отобранные сегменты последовательностей собирали в полные последовательности V-области, которые были лишены значимых Т-клеточных эпитопов. Затем выбирали пять последовательностей тяжелой цепи (VH1-VH5) и четыре последовательности легкой цепи (Vk1-Vk4) для синтеза и экспрессии генов в клетках млекопитающих. Аминокислотные последовательности VH1-VH5 показаны в перечне последовательностей как SEQ ID NO: 7-11, соответственно.
- 15 Аминокислотные последовательности Vk1-Vk4 показаны в перечне последовательностей как SEQ ID NO: 13-16, соответственно.

Конструирование химерного антитела и гуманизированных вариантов

- Последовательности VH и Vk IFX-1 (VH0 (SEQ ID NO: 6) и Vk0 (SEQ ID NO: 12)) и их гуманизированные варианты синтезировали с фланкирующими сайтами рестрикционных ферментов для клонирования в систему вектора экспрессии pANT от Abzema для человеческой тяжелой цепи IgG4 (S241P) и легкой каппа-цепи, соответственно. Области VH клонировали между рестрикционными сайтами Mlu I и Hind III, и области Vk клонировали между рестрикционными сайтами BssH II и BamH I.
- 25 Все конструкции подтверждали секвенированием.

Экспрессия и очистка антител

- Химерные IFX-1 (VH0/Vk0), два контрольных антитела (VH0/Vk1, VH1/Vk0) и комбинации составных цепей VH IgG4 (S241P) и Vk (в общей сложности 23 пары, **Таблица**
- 30 **1**) временно трансфицировали в адгезивные клетки НЕК EBNA (LGC Standards, Теддингтон, Великобритания) с использованием метода трансфекции ПЭИ и инкубировали в течение семи дней после трансфекции. Титры антител в супернатанте определяли с помощью ИФА, и отмечали, что варианты, содержащие VH1, показали стабильно более низкую экспрессию по сравнению с другими вариантами (данные не приведены).

Таблица 1. Сводная таблица антител, полученных с помощью временной трансфекции (зачеркнутые ячейки), включая химерный вариант (VH0/Vκ0), два контрольных гуманизированных варианта (VH1/Vκ0 и VH0/Vκ1) и 20 вариантов IFX-1 Composite Human Antibody™.

	VH0	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5
Vκ0	X	X				
Vκ1	X	X	X	X	X	X
Vκ2		X	X	X	X	X
Vκ3		X	X	X	X	X
Vκ4		X	X	X	X	X

Антитела (за исключением плохо экспрессируемых вариантов VH1) очищали из супернатантов клеточной культуры на колонках с сефарозой и белком А (GE Healthcare, Литл-Чалфонт, Великобритания), буфер заменяли 1х ФСБ с pH 7,2 и количественно определяли по OD_{280 нм} с использованием коэффициента экстинкции (E_{c(0,1%)}) на основе прогнозируемой аминокислотной последовательности. Антитела анализировали с использованием электрофореза в ДСН-ПААГ путем загрузки 1 мкг каждого антитела на гель, и наблюдали полосы, соответствующие профилю типичного антитела (данные не приведены).

Пример 2: Сравнение различных клонов IFX-2 с исходным антителом IFX-1

МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Для анализа CD11b:

- ACD, Sigma Aldrich (Тауфкирхен, Германия), № по каталогу C3821-50ML
- реагенты для проточного цитометра (все от BD Bioscience, Нью-Джерси, США)
 - Проточная жидкость FACSFlow™, № по каталогу 342003
 - Промывочный раствор для FACS, № по каталогу 334224
 - Очищающий раствор для FACS, № по каталогу 340345
 - Крысиное антитело к мышинному CD11b:FITC, № по каталогу 553310, 0,5 мг/мл
 - 10× лизирующий раствор, BD Bioscience (Нью-Джерси, США), № по каталогу 349202, 1:10, разведен в воде AnalaR

- HBSS, Life Technologies GmbH (Дармштадт, Германия), № по каталогу 14025-050
- ФБС, Invitrogen (Калифорния, США), № по каталогу 10099133, инактивация нагреванием: 56°C, 30 мин
- 5 ○ азид натрия, Merck (Дармштадт, Германия), № по каталогу 1.06688.0250
- рекомбинантный C5a человека (rhC5a), Sigma Aldrich (Тауфкирхен, Германия), № по каталогу C5788-1MG, экспрессированный в *E. coli*, чистота: ~95%, растворенный в стерильной воде Analab
- 10 ○ буфер для окрашивания (SB-буфер): 1% инактивированной нагреванием ФБС + 0,1% азид натрия в 1× ФБС
- кровь человека (используется немедленно) от здорового донора, содержащая 12% ACD

Для ИФА ФК на основе C5a:

- 15 ○ Вода Analab, VWR International (Дармштадт, Германия), № по каталогу 102923C
- рекомбинантный C5a человека (rhC5a), Nycult Biotech (Уден, Нидерланды), № по каталогу HC2101, экспрессированный в *E. coli*, растворенный в стерильной воде Analab
- 20 ○ дезаргининовое производное rhC5a (rhC5aDArg), Nycult Biotech (Уден, Нидерланды), № по каталогу HC2102, экспрессированное в *E. coli*, растворенное в стерильной воде Analab
- IFX-1, антитело к C5a человека, применяемое в качестве контроля, InflaRx (Йена, Германия), 10 мг/мл в ФБС + 0,05% Tween 80
- 25 ○ мышинное антитело к человеческому IgG4:ПХ, AbD Serotec (Пуххайм, Германия), № по каталогу MCA2098P, 1 мг/мл
- Na₂CO₃, Sigma-Aldrich (Тауфкирхен, Германия), № по каталогу 71350 (Sigma, Висконсин, США, № по каталогу 31432)
- NaHCO₃, VWR International (Дармштадт, Германия), № по каталогу L1730
- 30 ○ NaN₃, VWR International, (Дармштадт, Германия), № по каталогу 1.06688.0100
- Порошок ФБС, Sigma-Aldrich (Тауфкирхен, Германия), № по каталогу P5368-10ПАК, 1 упаковка, растворенная в 1000 мл деионизированной воды

- Tween 20, Sigma-Aldrich, (Тауфкирхен, Германия), № по каталогу P1379-25ML
- БСА, Sigma-Aldrich (Тауфкирхен, Германия), № по каталогу A7030-100G
- буфер для покрытия: 1,59 г Na_2CO_3 + 2,93 г NaHCO_3 + 0,2 г NaN_3 в 1000 мл воды AnalaR, pH 9,6
- промывочный буфер: 1х ФСБ + 0,05% Tween 20
- разбавитель для анализа: 3% БСА в 1х ФСБ + 0,05% Tween 20 (3% БСА/ФСБТ)
- Субстрат ТМВ (раствор субстрата С), BioLegend/Biozol (Гейдельберг, Германия), № по каталогу BLD-78105
- стоп-раствор: серная кислота (Sigma-Aldrich, № по каталогу 258105-100ML), 1:10, разведенная в воде AnalaR

Для гемолитической активности в плазме (CH50):

- Вода AnalaR, VWR International (Дармштад, Германия), № по каталогу 102923C
- Анализ CH50 комплемента, Naemoscan (Гронинген, Нидерланды), № по каталогу K002
- Пул плазмы здоровых людей, huPP-013, собственный препарат

МЕТОДЫ

ИФА на основе rhC5a

- Для ИФА 100 мкл rhC5a (1 мкг/мл) наносили на 96-луночный планшет для ИФА в течение ночи при 4°C. Планшет промывали (5×) и блокировали 200 мкл блокирующего буфера в течение 1 ч при 37°C. После этапов промывки (5×) в лунки, покрытые C5a, добавляли клоны IFX в 2-кратном последовательном разведении от 250 нг/мл до 3,91 нг/мл. После 2-часовой инкубации при 37°C и этапов промывки (5×) 0,04 мкг/мл ПХ-меченого антитела к IgG4 человека наносили в течение 1 ч при 37°C для детектирования связанных клонов IFX. Для проявления окрашивания после промывки (5×) добавляли 100 мкл субстрата ТМВ и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Цветную реакцию останавливали 100 мкл стоп-раствора. Считывание поглощения при 450 нм выполняли в течение 30 минут после цветной реакции с использованием считывающего устройства для планшетов. Вычитание значения холостого образца выполняли с использованием необработанных данных.

Гемолитическая активность в плазме (CH50)

Титр общей гемолитической способности комплемента (CH50) является обычным методом определения активации классического пути комплемента. Вкратце, эритроциты овцы (sRBC) готовили из свежей цельной крови овец центрифугированием и сенсibilизировали антителом к sRBC. Образцы плазмы от здоровых добровольцев, содержащие клоны IFX, последовательно разводили и инкубировали с сенсibilизированными sRBC при 37°C в течение 30 мин. После инкубации смесь центрифугировали, и степень гемолиза количественно определяли путем измерения поглощения гемоглобина, высвобожденного в супернатант, при 450 нм. Величину активности комплемента определяли путем изучения способности различных разведений тестируемого образца плазмы лизировать сенсibilизированные sRBC.

Анализ активности CD11b

Цельную кровь человека стимулировали 16,7 нМ rhC5a. Чтобы протестировать блокирующую активность клонов IFX-1 и IFX-2 в отношении rhC5a-индуцированной положительной регуляции CD11b, антитела разводили до конечной концентрации с соотношением Ag:Ab 1:1. Кровь, инкубированную только с буфером (контрольный HBSS), использовали в качестве условия без стимуляции для оценки исходной экспрессии CD11b. Кровь, содержащую только антитело IFX, использовали для исключения ингибирующего или стимулирующего эффекта антитела на кровь человека. Смешанные образцы инкубировали при 37°C в течение 20 мин для индукции C5a-опосредуемой положительной регуляции CD11b. Затем FITC-конъюгированное антитело к мышиному CD11b дополнительно инкубировали с образцами в течение 30 минут на льду для окрашивания CD11b на клеточной поверхности гранулоцитов. Сигнал флуоресценции регистрировали с помощью проточного цитометра.

Статистический анализ

Графики и статистический анализ выполняли с помощью GraphPad PRISM® V7.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клоны IFX-2 одинаково хорошо связывались с C5a по сравнению с IFX-1

Для характеристики связывания клонов IFX-2 с C5a применяли платформу ИФА на основе rhC5a. 12× клонов IFX-2 и 1× IFX-1 (VH0Vk0) в диапазоне от 3,91 нг/мл до 250 нг/мл вносили в качестве образцов в 96-луночный планшет, покрытый 1 мкг/мл rhC5a. Затем клоны IFX, захваченные C5a, детектировали с использованием 0,04 мкг/мл ПХ-конъюгированного МАТ к IgG4 человека. Чем больше антител IFX связалось с C5a, тем более сильный хемилюминесцентный сигнал появится. Как показано на **Фигуре 1**, все тестируемые антитела в применяемом диапазоне концентраций связывались с rhC5a, нанесенным в виде покрытия, сопоставимым дозозависимым образом.

Сходный анализ на основе ИФА выполняли в ABZENA для количественного определения ЭК₅₀ клонов IFX в отношении связывания C5a. В диапазоне 0-100 нг/мл все клоны IFX показали очень сходное связывание с C5a. По сравнению с исходной молекулой IFX-1 относительные ЭК₅₀ всех клонов IFX-2 находились в пределах 2-кратного диапазона, медианное значение составляло 1,04 (Таблица 2).

Таблица 2. ЭК₅₀ IFX-2 относительно IFX-1 (VH0Vk0) для аффинности связывания C5a.

Идентификатор образца	Относительная ЭК ₅₀	Идентификатор образца	Относительная ЭК ₅₀
VH0Vk0 (IFX-1)	1,00	VH4Vk3	0,91
VH2Vk3	1,09	VH4Vk4	1,03
VH2Vk4	0,99	VH5Vk1	1,28
VH3Vk2	1,05	VH5Vk2	1,05
VH3Vk4	0,86	VH5Vk3	1,14
VH4Vk1	1,00	VH5Vk4	1,53
VH4Vk2	0,86	Медиана клонов IFX-2	1,04

Антитела IFX-2 не ингибировали образование мембраноатакующего комплекса (МАК)

Известно, что исходный IFX-1 (VH0Vk0) нейтрализует C5a без нарушения расщепления C5 на C5a и C5b. C5b является исходным материалом мембраноатакующего комплекса C5b-9, который является конечным продуктом классического пути комплемента и образует поры в мембранах. Титр общей гемолитической способности комплемента (CH50) использовали для индексации активации классического пути комплемента за счет МАК-опосредуемого гемолиза

сенсibilизированных эритроцитов овцы (SRBC). Объединенную человеческую плазму с исходной концентрацией 100 мкг/мл соответствующих клонов IFX (12× IFX-2 и 1× IFX-1 (VH0Vk0)) последовательно разводили в 4, 8, 16, 32, 64 и 128 раз и инкубировали с суспензией эритроцитов. Степень гемолиза количественно определяли путем измерения поглощения гемоглобина, высвобожденного в супернатант, при 450 нм.

Таблица 3. CH50 (коэффициент разведения в плазме) каждого тестируемого клона IFX.

Идентификатор образца	CH50 (DF, кратность)	Идентификатор образца	CH50 (DF, кратность)
VH0Vk0 (IFX-1)	74,25	VH4Vk3	70,47
VH2Vk3	72,62	VH4Vk4	75,31
VH2Vk4	74,19	VH5Vk1	71,20
VH3Vk2	76,71	VH5Vk2	74,21
VH3Vk4	75,46	VH5Vk3	73,24
VH4Vk1	75,69	VH5Vk4	76,87
VH4Vk2	72,04	Медиана клонов IFX-2	74,20

Как показано на **Фигуре 2** и в Таблице 3, для достижения 50% гемолиза (CH50) требовалось 70-77-кратное (медиана 74-кратное) разведение клонов IFX-2 или 74-кратное разведение исходной молекулы IFX-1, что полностью сопоставимо. Это продемонстрировало, что мутации клонов IFX-2 не нарушают активацию классического пути комплемента.

15 Антитела IFX-2 эффективно блокировали положительную регуляцию CD11b, запускаемую rhC5a

Положительная регуляция CD11b на поверхности гранулоцитов человека детектируется в течение нескольких минут после добавления rhC5a в цельную кровь человека. Уровни CD11b определяли с использованием флуоресцентномеченого антитела к CD11b и указывали как среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ). Блокирование положительной регуляции CD11b, запускаемой rhC5a, оценивали с использованием 12× антител IFX-2 по сравнению с IFX-1 в двух анализах активности CD11b. В обоих анализах в качестве стимула использовали 16,7 нМ rhC5a, который, соответственно, индуцировал 3,65- и 5,89-кратную положительную регуляцию экспрессии CD11b. Все клоны IFX тестировали в молярном соотношении 1:1 для

блокады положительной регуляции CD11b. Блокирующую активность клонов IFX рассчитывали в соответствии с соответствующим изменением интенсивности флуоресценции для rhC5a-стимулированного условия. Активность исходной молекулы IFX-1 устанавливали как 100%. При соотношении rhC5a:клон IFX равном 1:1 клоны IFX-2 показали 94-104% относительной блокирующей активности (см. **Фигуру 3**). Медиана относительной блокирующей активности клонов IFX-2 составила 100,68%.

Пример 3: Анализ АЛС у примата, отличного от человека, после лечения IFX-1/IFX-2

МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 4. Реагенты и их поставщики.

предшественники	Поставщик	Номер продукта
Вода Analar	VWR International	102923C
Авидин-ПХ	Biolegend	405103
Раствор С (ТМВ)	Biolegend	78105
Кроличье поликлональное антитело IgG4 CaCP29	Charles River	неприменимо
IFX-1	InflaRx	неприменимо
IFX-2	InflaRx	неприменимо
Блокирующий буфер I	AppliChem	A7099.0500
Буфер Cross Down	AppliChem	A6485.0500
Сыворотка обезьяны	LPT Hamburg	неприменимо
Порошок ФСБ	Sigma-Aldrich	P5368-10PAK
Азид натрия NaN ₃	VWR International	1.06688.0100
Бикарбонат натрия NaHCO ₃	VWR International	L1703
Карбонат натрия Na ₂ CO ₃	Honeywell	31432-250G
Серная кислота H ₂ SO ₄	VWR International	258105-100ML
Tween20	Sigma-Aldrich	P1379-25ML

МЕТОД

Антитела к лекарственному средству определяют с помощью двухэтапного подхода. Образцы сыворотки подвергают скринингу на наличие антител к лекарственному средству в скрининговом ИФА на АЛС. Фиксированная точка отсечения анализа, основанная на оптической плотности (ОП), составляет 0,102 (согласно валидации скринингового ИФА на АЛС с человеческой плазмой для детектирования АЛС против IFX-1) и должна приводить к получению 9% ложноположительных образцов. Таким образом, образцы, полученные с положительным результатом скринингового ИФА на АЛС, должны быть проанализированы в подтверждающем ИФА на АЛС для подтверждения или отклонения результатов и определения концентрации АЛС, если это применимо.

Скрининговый ИФА на АЛС представляет собой мостиковый ИФА с применением препарата IFX-1 (антитело к С5а человека) в качестве захватывающего антитела (немеченого) и детектирующего антитела (меченого биотином). Антитела к лекарственному средству, используемые для получения калибровочной кривой (CAL) и добавления в известной концентрации образцов для контроля качества (QC), очищали из сыворотки кролика после иммунизации кролика очищенным IFX-1. Поскольку антитела к лекарственному средству имеют два сайта связывания, они могут связывать (образовывать мостик) как захватывающий IFX-1, так и меченый IFX-1, используемый для детектирования. Все образцы плазмы с положительным результатом скрининга на АЛС повторно оценивают в подтверждающем ИФА на АЛС, который основан на настройке ИФА на скрининг АЛС. К образцам добавляют дополнительный свободный немеченый препарат (IFX-1) для конкуренции со связыванием потенциальных антител к лекарственному средству с захваченным IFX-1 на планшете. При наличии антител к лекарственному средству они будут связываться с добавленным свободным немеченым IFX-1 и, следовательно, будут недетектируемыми. Если наблюдается ингибирование АЛС, специфичных в отношении лекарственного средства, и результат скрининга подтверждается, образец считается подтвержденным положительным.

Скрининговый ИФА на АЛС и подтверждающий ИФА на АЛС проводили, как описано ниже:

Вкратце, 100 мкл/лунку захватывающего антитела (IFX-1, 0,5 мкг/мл) инкубируют в течение ночи при температуре $5 \pm 3^\circ\text{C}$ на планшетах с высокой емкостью связывания. После этапа промывки по 200 мкл блокирующего буфера пипетируют в каждую лунку и планшет инкубируют в течение 2 часов при $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. После другого этапа промывки по 100 мкл/лунку калибровочных образцов, образцов для контроля

качества и образцов, представляющих интерес (тестируемые образцы), пипетируют в лунки и инкубируют в течение 2 часов при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. После этапа промывки по 100 мкл детектирующего антитела (биотинилированного IFX-1, 0,08 мкг/мл) пипетируют в каждую лунку для инкубации в течение 60 минут при $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

- 5 Затем планшеты промывают и в каждую лунку добавляют по 100 мкл разведенного авидина-ПХ (1:3000) и инкубируют в течение 30 минут при $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. После заключительного этапа промывки добавляют по 100 мкл/лунку ТМВ (раствор субстрата), инкубируют в течение 5 минут при комнатной температуре без доступа света, и реакцию останавливают добавлением 100 мкл/лунку разбавленной серной кислоты.
- 10 Интенсивность окрашивания анализируют при 450 нм с помощью считывающего устройства Tecan Infinite M200 с использованием программного обеспечения Magellan™ 6.5.

- Образцы плазмы с неизвестными концентрациями АЛС разводят в соотношении 1:2 в буфере CrossDown перед анализом с помощью скринингового ИФА на АЛС. Для
- 15 повторной оценки в подтверждающем ИФА на АЛС образцы разводят 1:2 один раз в буфере CrossDown и один раз в буфере CrossDown с добавлением известной концентрации препарата (концентрация IFX-1 100 мкг/мл).

- Образцы со значением ОП ниже 0,102 в скрининговом анализе на АЛС классифицируют как «отрицательные». Образцы с блокированием более 50% сигнала в
- 20 подтверждающем анализе на АЛС классифицируют как «подтвержденные положительные». Результаты показаны в Таблице 5.

РЕЗУЛЬТАТ

- 25 У животных, получавших IFX-2, через 8 недель после введения не появились детектируемые АЛС.

Таблица 5. Сводные результаты скринингового и подтверждающего ИФА на АЛС

Животные, получавшие IFX-1			Животные, получавшие IFX-2		
идентификатор животного (временная точка)	Скрининг АЛС	Подтверждение АЛС	идентификатор животного (временная точка)	Скрининг АЛС	Подтверждение АЛС

№ 1 (предварительный)	отрицательный	неприменимо	№ 13 (предварительный)	отрицательный	неприменимо
№ 1 (TD 57)	отрицательный	неприменимо	№ 13 (TD 57)	отрицательный	неприменимо
№ 2 (предварительный)	отрицательный	неприменимо	№ 14 (предварительный)	отрицательный	неприменимо
№ 2 (TD 57)	потенциально положительный	подтвержденный положительный	№ 14 (TD 57)	отрицательный	неприменимо
№ 3 (предварительный)	отрицательный	неприменимо	№ 15 (предварительный)	отрицательный	неприменимо
№ 3 (TD 57)	отрицательный	неприменимо	№ 15 (TD 57)	отрицательный	неприменимо
№ 4 (предварительный)	отрицательный	неприменимо	№ 16 (предварительный)	отрицательный	неприменимо
№ 4 (TD 57)	потенциально положительный	подтвержденный положительный	№ 16 (TD 57)	отрицательный	неприменимо
№ 5 (предварительный)	отрицательный	неприменимо	№ 17 (предварительный)	отрицательный	неприменимо
№ 5 (TD 57)	отрицательный	неприменимо	№ 17 (TD 57)	отрицательный	неприменимо
№ 6 (предварительный)	отрицательный	неприменимо	№ 18 (предварительный)	отрицательный	неприменимо
№ 6 (TD 57)	отрицательный	неприменимо	№ 18 (TD 57)	отрицательный	неприменимо

ОТКРЫТЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В
ТЕКСТОВОЙ ФОРМЕ

	SEQ ID NO: 6	VH0
5	SEQ ID NO: 7	VH1
	SEQ ID NO: 8	VH2
	SEQ ID NO: 9	VH3
	SEQ ID NO: 10	VH4
	SEQ ID NO: 11	VH5
10	SEQ ID NO: 12	V_каппа_0
	SEQ ID NO: 13	V_каппа_1
	SEQ ID NO: 14	V_каппа_2
	SEQ ID NO: 15	V_каппа_3
	SEQ ID NO: 16	V_каппа_4
15	SEQ ID NO: 17	Консенсусная последовательность, образованная из комбинации VH1-VH5
	SEQ ID NO: 18	Консенсусная последовательность, образованная из комбинации V_каппа_1-V_каппа_4
20	SEQ ID NO: 20	CDR1 тяжелой цепи IFX-1
	SEQ ID NO: 21	CDR2 тяжелой цепи IFX-1
	SEQ ID NO: 22	CDR3 тяжелой цепи IFX-1
	SEQ ID NO: 23	CDR1 легкой цепи IFX-1
	SEQ ID NO: 24	CDR2 легкой цепи IFX-1
25	SEQ ID NO: 25	CDR3 легкой цепи IFX-1

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL),

причем указанный домен VH содержит, по существу состоит или состоит из

5 аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 10 (QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT TFWMDWVRQA PGQGLEWIGR IDPSDSESLR DQRFKDRVTM TVDKSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARGN DGYYGFA YWG QGTLVTVSS, VH4) или

10 аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, при этом указанная аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, содержит последовательности CDR1H, CDR2H и CDR3H из SEQ ID NO: 20-22, соответственно, и при этом указанная аминокислотная

15 последовательность, имеющая по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, содержит V в положении аминокислоты 5, E в положении аминокислоты 10, K в положении аминокислоты 12, K в положении аминокислоты 13, A в положении аминокислоты 16, A в положении аминокислоты 40 и/или T в положении

20 аминокислоты 76, и

причем указанный домен VL содержит, по существу состоит или состоит из

аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 16 (DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQSVD YDGDSYMKWY QKPKGKAPKL LIYAASNLSQ GVPSRFSGSG SGTDFLTIS

25 SLQPEDFATY YCQQSNEDPY TFGQGTKLEI K, V_K4) или

аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16, при этом указанная аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16, содержит последовательности CDR1L, CDR2L, CDR3L из SEQ ID NO: 23-25, соответственно, и при этом указанная аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16, содержит A в положении аминокислоты 13, V в положении аминокислоты 15, D в положении

30

- аминокислоты 17, V в положении аминокислоты 19, T в положении аминокислоты 22, K в положении аминокислоты 46, A в положении аминокислоты 47, S в положении аминокислоты 64, T в положении аминокислоты 78, S в положении аминокислоты 80, S в положении аминокислоты 81, L в положении аминокислоты 82, Q в положении аминокислоты 83, F в положении аминокислоты 87 и/или Q в положении аминокислоты 104.
- 5
2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL),
- 10
- причем указанный домен VH содержит, по существу состоит или состоит из
- аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 17
- (QVQLVQSGX⁹E X¹¹KKPGASVKX²⁰ SCKASGYSFT TFWMDWVX³⁸QA
- PGQGLEWX⁴⁸GR IDPSDSESRL DQX⁶³FKDRX⁶⁸TX⁷⁰ TVDKSTSTVY
- 15
- MX⁸²LSSX⁸⁶X⁸⁷SED X⁹¹AVYYCARGN DGYYGFAIYWG QGTLTVSS),
- где X⁹ представляет собой A или P, X¹¹ представляет собой L или V, X²⁰ представляет собой I или V, X³⁸ представляет собой K или R, X⁴⁸ представляет собой I или M, X⁶³ представляет собой K или R, X⁶⁸ представляет собой A или V, X⁷⁰ представляет собой L или M, X⁸²
- 20
- представляет собой E или Q, X⁸⁶ представляет собой L или P, X⁸⁷ представляет собой R или T и X⁹¹ представляет собой S или T, или
- аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 17,
- имеющей одну, две или три аминокислотные замены, при этом указанная
- аминокислотная последовательность, имеющая одну, две или три
- 25
- аминокислотные замены, содержит последовательности CDR1H, CDR2H, CDR3H из SEQ ID NO: 20-22, соответственно, и
- причем указанный домен VL содержит, по существу состоит или состоит из
- аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 18
- (DIX³X⁴TQSPX⁹S LX¹²ASVGDRVT ITCKASQSVD YDGD SYMKWY
- 30
- QQKPGKAPKL LIYAASNLS GX⁶²PSRFSGSG SGTDFTLTIS
- SLQX⁸⁴EDFATY YCQQSNEDPY TFGQGTKLEI K), где X³ представляет собой V или Q, X⁴ представляет собой L или M, X⁹ представляет собой A или S, X¹² представляет собой A или S, X⁶² представляет собой I или V и X⁸⁴ представляет собой E или P, или

- аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 18, имеющей одну, две, три, четыре, пять, шесть или семь аминокислотных замен, при этом указанная аминокислотная последовательность, имеющая одну, две, три, четыре, пять, шесть или семь аминокислотных замен, содержит последовательности CDR1L, CDR2L, CDR3L из SEQ ID NO: 23-25, соответственно.
- 5
3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, причем указанный домен VH содержит, по существу состоит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из VH1-VH5 (SEQ ID NO: 7-11); и/или
- 10
- указанный домен VL содержит, по существу состоит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из Vk1-Vk4 (SEQ ID NO: 13-16).
- 15
4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:
- а) домен VH, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 10 (VH4), и домен VL, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 16 (Vk4), или
- 20
- б) домен VH, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 11 (VH5), и домен VL, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 15 (Vk3).
- 25
5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело.
- 30
6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, дополнительно содержащий константный домен, причем указанный константный домен содержит, по существу состоит или состоит из аминокислотной

последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 19 (константный домен IgG4 WT),

причем указанная аминокислотная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 19 необязательно содержит одну или более из следующих аминокислотных замен:

- аминокислотную замену S108P;
- аминокислотные замены T130Q и M308L;
- аминокислотные замены M132Y, S134T и T136E.

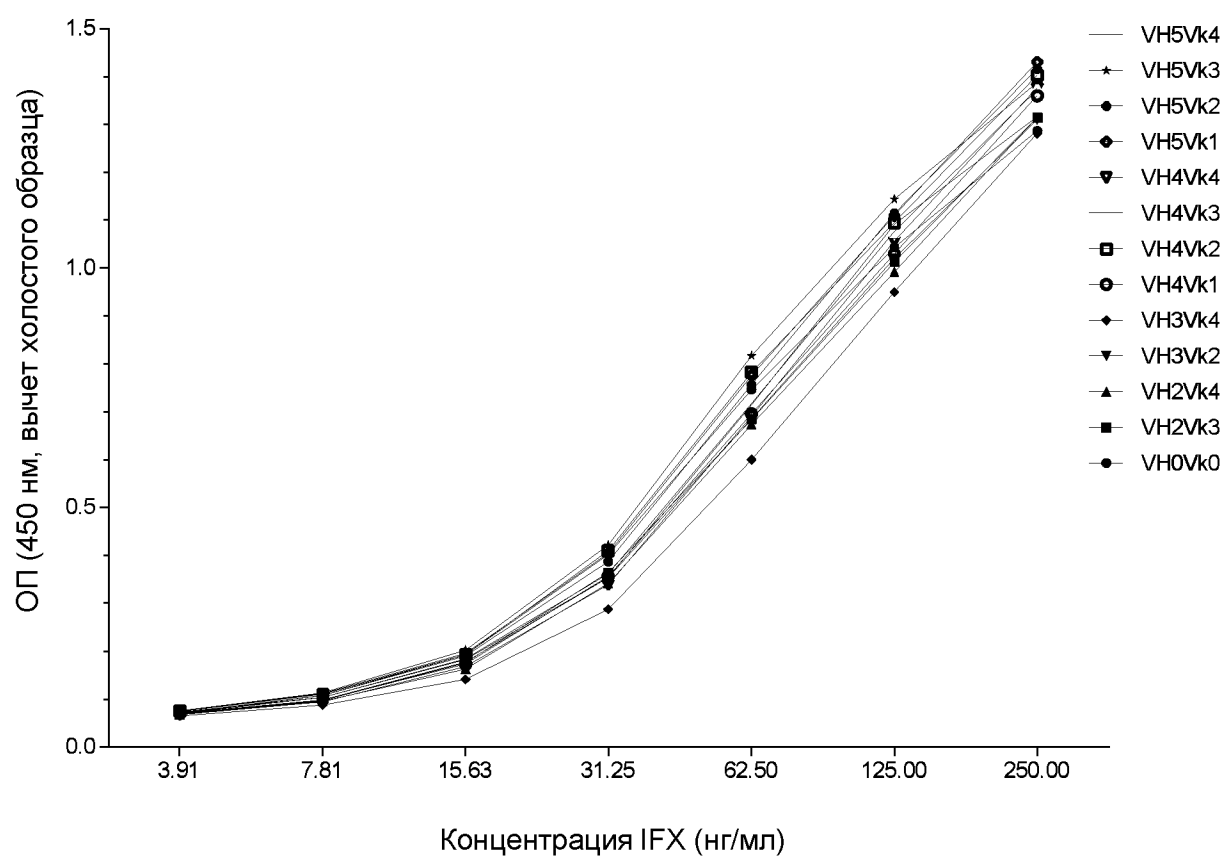
7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий фрагмент антитела выбран из группы, состоящей из фрагментов Fab, фрагментов Fab', фрагментов F(ab')₂, фрагментов Fd, фрагментов Fv, связанных дисульфидными связями Fv (dsFv), однодоменных антител и одноцепочечных антител Fv (scFv).

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент проявляет одно или более из следующих свойств:

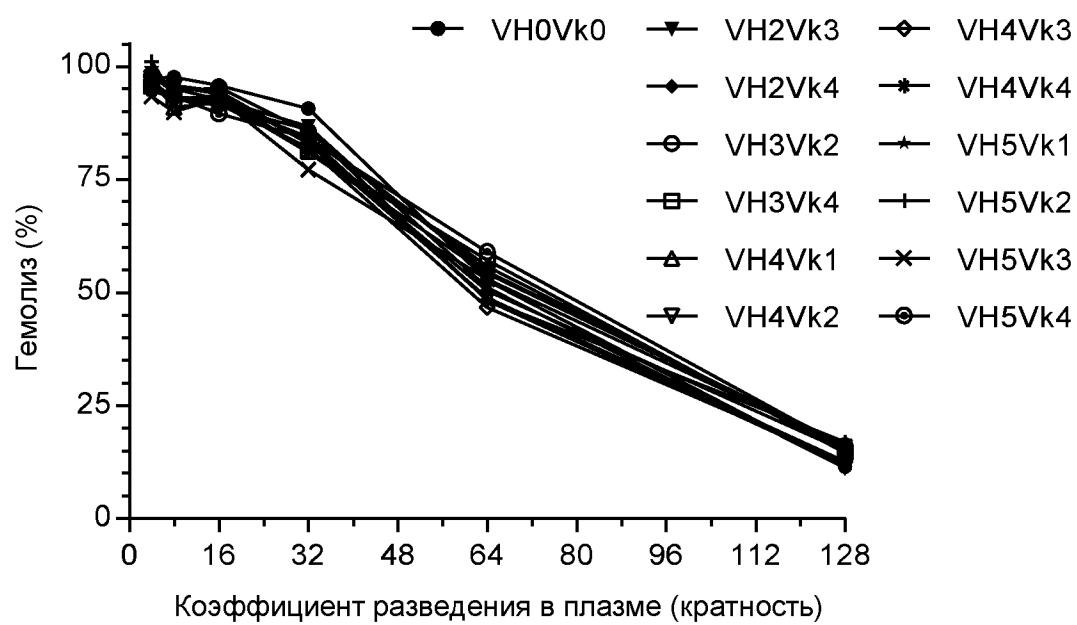
- указанное антитело или указанный его антигенсвязывающий фрагмент имеет константу связывания с C5a со значением K_d 10 нМ или менее;
- указанное антитело или указанный его антигенсвязывающий фрагмент проявляет по меньшей мере 75% блокирующую активность в отношении биологических эффектов, индуцированных одной молекулой C5a;
- указанное антитело или указанный его антигенсвязывающий фрагмент не ингибирует активность CН50 в плазме человека;
- указанное антитело или указанный его антигенсвязывающий фрагмент обладает сниженной иммуногенностью по сравнению с IFX-1.

9. Фармацевтическая композиция, содержащая:
антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-8; и
дополнительно содержащая один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей, вспомогательных веществ, наполнителей, связывающих агентов, смазывающих агентов, веществ, способствующих скольжению, разрыхлителей, адсорбентов и/или консервантов.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-8 для применения в медицине.
- 5 11. Соединение по любому из пп. 1-8 для применения в лечении или предотвращении заболевания или нарушения, в которое вовлечена патологическая активность C5a.
12. Соединение для применения по п. 11, отличающееся тем, что указанное заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из
 - 10 - аутоиммунных нарушений,
 - воспалительных нарушений, аутовоспалительных нарушений или связанных с ними состояний,
 - сердечно-сосудистых или цереброваскулярных нарушений,
 - бактериальных или вирусных инфекций,
 - 15 - нейродегенеративных нарушений или связанных с ними заболеваний, и
 - разных видов рака или предраковых состояний.



Фиг. 2



Фиг. 3

