

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391666** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.07.27

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.12.03

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНЕЙ ГЛАЗ**

(31) 63/121,629

(32) 2020.12.04

(33) US

(86) PCT/US2021/061755

(87) WO 2022/120137 2022.06.09

(71) Заявитель:
АННЕКСОН, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Гровер Анита, Тейлор Лори, Йеднок
Тед (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение в целом относится к композициям и способам предупреждения, снижения риска развития или лечения болезни глаз (например, глаукомы или возрастной макулодистрофии). Возрастная макулодистрофия может представлять собой географическую атрофию.

202391666
A1

202391666

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578374EA/081

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНЕЙ ГЛАЗ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая патентная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 63/121,629, поданной 4 декабря 2020 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Глаукома и возрастная макулодистрофия (AMD) являются основной причиной необратимой слепоты во всем мире. Географическая атрофия (GA), также известная как атрофическая AMD или запущенная сухая AMD, является запущенной формой AMD. Распространенность в мире глаукомы среди населения в возрасте 40-80 лет составляет 3,54% (95% CrI, 2,09-5,82). Прогнозируется, что к 2040 г. распространенность вырастет до 112 миллионов во всем мире и 4,7 миллиона в Северной Америке. Одобренные в настоящее время средства лечения глаукомы ограничиваются снижением внутриглазного давления (IOP). Обычно применяются хирургическое вмешательство, лазерное лечение или средства, снижающие IOP. Тем не менее, даже при высоком контроле IOP с помощью лекарственного средства или хирургического вмешательства многие пациенты с глаукомой продолжают испытывать прогрессирующую потерю зрения. Кроме того, не существует одобренных видов лечения или средств терапии GA. Таким образом, существует значительная неудовлетворенная потребность в нейропротекторных видах лечения пациентов, у которых контроль IOP является недостаточным для предупреждения потери ганглиозных клеток, аксонов или синапсов, что приводит к прогрессирующей и необратимой потере зрения. Таким образом, существует потребность в новых средствах терапии для предупреждения, снижения риска развития и лечения болезней глаз (таких как глаукома и AMD, включая географическую атрофию).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение в целом относится к композициям и способам предупреждения, снижения риска развития или лечения болезни глаз (например, глаукомы или возрастной макулодистрофии, такой как AMD, включая географическую атрофию) у пациента-человека. Такие способы включают введение пациенту композиции, содержащей от около 1 мг до около 10 мг антитела к C1q, путем интравитреальной инъекции, при этом антитело содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий HVR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HVR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и HVR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий HVR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, HVR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и HVR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: NO: 11. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельный домен легкой цепи,

содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 95% гомологию с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 4 и 35-38, и где вариабельный домен легкой цепи содержит HVR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HVR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и HVR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4 и 35-38. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 95% гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 8 и 31-34, и где вариабельный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, HVR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и HVR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8 и 31-34. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, с по меньшей мере около 95% гомологией с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 4 и 35-38, и где вариабельный домен легкой цепи содержит HVR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HVR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и HVR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, с по меньшей мере около 95% гомологией с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 8 и 31-34, и где вариабельный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, HVR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и HVR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4 и 35-38, и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8 и 31-34. Антитело может представлять собой моноклональное антитело, гуманизированное антитело, человеческое антитело, химерное антитело, фрагмент антитела или производное антитела. Фрагмент антитела может представлять собой фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент F_v, диатело или молекулу одноцепочечного антитела. В некоторых вариантах осуществления фрагмент Fab содержит фрагмент Fab тяжелой цепи SEQ ID NO: 39 и фрагмент Fab легкой цепи SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления антитело вводят один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в месяц, один раз в 4 недели, один раз в 6

недель, один раз в 8 недель, один раз в два месяца, один раз в 10 недель, один раз в 12 недель, один раз в три месяца или один раз в 4 месяца. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят в течение по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев или по меньшей мере 12 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления вводимая композиция содержит около 1 мг, около 1,5 мг, около 2 мг, около 2,5 мг, около 3 мг, около 3,5 мг, около 4 мг, около 4,5 мг, около 5 мг, около 5,5 мг, около 6 мг, около 6,5 мг, около 7 мг, около 7,5 мг, около 8 мг, около 8,5 мг, около 9 мг, около 9,5 мг или около 10 мг антитела к C1q. Вводимая композиция может содержать от около 1 мг до около 5 мг антитела к C1q. Вводимая композиция может содержать от около 1 мг до около 2,5 мг, от около 2,5 мг до около 5 мг, от около 5 мг до около 7,5 мг или от около 7,5 мг до около 10 мг антитела к C1q. Вводимая композиция может содержать около 5 мг антитела к C1q. Вводимая композиция может содержать около 10 мг антитела к C1q.

В некоторых вариантах осуществления болезнь глаз представляет собой глаукому или возрастную макулодистрофию, такую как географическая атрофия.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фигуре 1 изображен анализ связывания C1q человека. Связывание Mab2-Fab, FabA и Mab2 с C1q человека в одностороннем ELISA. Связанное антитело или молекулы Fab обнаруживали с использованием меченого ферментом антитела к Fc человека или антитела к каппа-цепи человека, а затем ферментного субстрата. Антитела демонстрировали сопоставимую аффинность связывания с C1q человека. EC50 для Mab2-Fab, FabA и Mab2=4,4, 2,5 и 4,9 нг/мл соответственно (диапазон 34-95 пМ).

На фигуре 2 изображено, что FabA ингибирует классический, но не лектиновый и альтернативный пути системы комплемента. FabA и Mab2 оценивали в отношении их способности ингибировать классический, лектиновый и альтернативный пути с использованием наборов для анализа на основе ELISA от Eurodiagnostica (Weislab™). Лунки покрывают специфическими активаторами классического пути (IgM), лектинового пути (маннан) или альтернативного пути (липополисахарид), и активацию всех путей оценивают с использованием антитела для детекции терминального комплекса C5b-9. Ингибирующее антитело к C5 использовали в качестве положительного контроля. FabA и Mab2 селективно блокируют классический путь с $IC_{50} \leq 0,3$ мкг/мл, в то время как антитело к C5 ингибирует все три пути.

На фигуре 3 изображено ингибирование гемолиза RBC, покрытых IgM, в сыворотке крови человека. Овечьи RBC, предварительно сенсibilизированные поверхностно-реактивными поликлональными антителами на основе IgM, коинкубировали с сывороткой крови человека (разведенной в 100 раз) при 37°C в течение 20-30 минут. Гемолиз RBC количественно определяли путем измерения высвобождения гемоглобина и выражали в виде процента гемолиза, индуцированного отсутствием лечения.

На фигуре 4 изображено снижение количества поврежденных аксонов в зрительных нервах глаз, обработанных Mab1-Fab, Mab1 или Mab2. Повышение ИОР индуцировали в одном глазу каждого животного путем инъекции 1 мкл полистироловых гранул размером 6 мкм, 1 мкл полистироловых гранул размером 10 мкм (Polybead Microspheres; Polysciences, Inc., Уоррингтон, Пенсильвания, США) и 1 мкл вязкоупругого раствора (10 мг/мл гиалуроната натрия Advanced Medical Optics Inc., США) в переднюю камеру глаза в день 1. Контралатеральный глаз оставляли необработанным в качестве контроля. Антитела Mab2, Mab1 и Mab1-Fab (Fab, полученные посредством ферментативного расщепления Mab1) и солевой раствор вводили в глаза, в которые вводили микрогранулы, интравитреально, за один день до инъекции микрогранул и через неделю (день 0 и день 7; 2 мкл солевого раствора антитела с концентрацией 10 мг/мл для каждой инъекции по сравнению с солевым раствором в отдельности). Через две недели после повреждения у животных собирали зрительные нервы (перфузировали солевым раствором и 4% раствором параформальдегид), постфиксировали 4% раствором параформальдегида и 1% раствором осмия, обезвоживали в возрастающей концентрации спирта и помещали в 1% уранилацетат/этанол. Нервы заливали эпоксидной смолой и нарезали полутонкие срезы (1 мкм). Общее количество дегенерирующих аксонов оценивали с применением программы StereoInvestigator (MicroBrightfield, Inc, Вермонт, США). Масштабная планка=20 мкм. Mab1-Fab и Mab2 значительно снижали образование поврежденных аксонов в зрительном нерве, в то время как антитело Mab1 продемонстрировало аналогичную тенденцию.

На фигурах 5A-5D изображена защита от потери фоторецепторных нейронов и функции сетчатки в модели фотоповреждения у мышей с использованием антитела Mab1. **На фигуре 5A** изображена модель фотоповреждения у мышей в течение 7 дней с последующим интравитреальным (IVT) введением антитела Mab1 и оценкой функции сетчатки и гистологии в день 14. Мышам вводили 1 мкл Mab1 с концентрацией 7,5 мг/мл или антитела изотипического контроля посредством IVT введения в день 7. **На фигуре 5B** изображено, что обработка Mab1 приводила к значимому снижению числа Tunel +ve фоторецепторных клеток во внешнем ядерном слое сетчатки по сравнению с изотипическим контролем. **На фигуре 5C** изображено, что обработка Mab1 приводила к повышению количества рядов фоторецепторных клеток во внешнем ядерном слое по сравнению с изотипическим контролем. **На фигуре 5D** изображено, что обработка антителом Mab1 приводила к значимому повышению А-волны и В-волны на электроретинограмме в день 14 по сравнению с антителом изотипического контроля.

На фигуре 6 изображен свободный С1q в водянистой влаге после однократной IVT инъекции.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Общая информация

Настоящее изобретение в целом относится к композициям и способам предупреждения, снижения риска развития или лечения болезни глаз (например,

глаукомы или возрастной макулодистрофии, такой как AMD, включая географическую атрофию).

В данном документе раскрыт антигенсвязывающий фрагмент (Fab) рекомбинантного гуманизированного иммуноглобулина G (IgG1), который ингибирует классический каскад системы комплемента, не влияя на лектиновые или альтернативные пути системы комплемента. Fab к C1q (например, FabA, Fab к C1q, содержащий фрагмент Fab тяжелой цепи SEQ ID NO: 39 и фрагмент Fab легкой цепи SEQ ID NO: 40) разрабатывали в качестве интравитреально (IVT) вводимого средства, для лечения для офтальмологических заболеваний, таких как глаукома и AMD, включая географическую атрофию (GA). Гипервариабельные области, полученные из мышиноного антитела M1 (антитело Mab1, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 3 и вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 7), экспрессировали в виде конструкции на основе фрагмента Fab IgG1 человека (FabA). Также экспрессировали полноразмерное антитело на основе IgG4 человека (Mab2, антитело, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 8 и вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 4), содержащее гипервариабельные области, полученные из Mab1. Mab1 и Mab2, а также их Fab (Mab1-Fab и Mab2-Fab) использовали в качестве суррогатных молекул для FabA в фармакологических исследованиях. В виде моновалентной конструкции на основе Fab, в которой отсутствуют константные домены 2 и 3 тяжелой цепи Fc (CH2 и CH3), FabA не может связываться с C1q посредством взаимодействий с доменом Fc. Более того, при наличии только одного антигенсвязывающего плеча FabA не проявляет агонистической активности в отношении C1q в широком диапазоне концентраций FabA.

Каскад системы комплемента является критическим компонентом врожденного иммунитета и может активироваться 3 различными путями: классическим, лектиновым и альтернативным путями системы комплемента. Все 3 пути приводят к активации компонента системы комплемента C3, что в конечном итоге приводит к рекрутингу иммунных клеток, воспалению, лизису мембран посредством мембраноатакующего комплекса и клеточной смерти.

C1q, инициирующая молекула классического каскада системы комплемента, участвует в инициации и распространении нейродегенеративных заболеваний, включая глаукому и AMD, включая GA. Ингибирование C1q может блокировать инициацию классического каскада системы комплемента и замедлять повреждение нейронов и синапсов посредством прямого снижения повреждения мембран нервных клеток и снижения воспалительных последствий активации системы комплемента.

Mab2-Fab и/или FabA демонстрируют высокую аффинность связывания с C1q человека, как измерено с помощью Biacore (<10 пМ) и с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) (40-50 пМ; фигура 1). Mab1 связывается с выделенными глобулярными головными доменами C1q, но не с коллагеновым хвостом C1q (как определено с помощью ELISA). В соответствии с данным открытием, Mab1 ингибирует взаимодействие субстрата, опосредованное глобулярным головным доменом

C1q (IgM, C-реактивный белок [CRP] и фосфатидилсерин); а FabA ингибирует функциональное взаимодействие C1q с эритроцитами (RBC), покрытыми иммуноглобулином M (IgM) (блокируя гемолиз; фигура 3). Антитело Mab1 специфично распознает C1q, не демонстрируя связывания с другими компонентами системы комплемента (C3b и C5) или с другими членами суперсемейства C1q/фактора некроза опухоли (TNF), включая TNF и адипонектин, белок, который обладает наибольшей идентичностью последовательности с C1q в его глобулярном головном домене. В соответствии с этими результатами, FabA не ингибирует лектиновый путь системы комплемента, который инициируется маннозо-связывающим лектином (MBL, другим членом суперсемейства C1q/TNF), а также не ингибирует альтернативный путь системы комплемента (инициируемый C3b, фигура 2).

Глаукома включает в себя группу прогрессирующих нарушений глаз, которые повреждают зрительный нерв, в конечном итоге приводя к потере зрения. При первичной открытоугольной глаукоме основной причиной повреждения зрительного нерва является повышенное внутриглазное давление (IOP), которое со временем приводит к характерной потере зрения при исследовании поля зрения. Эта потеря зрения происходит вследствие прогрессирующей дегенерации: (1) нейронов сетчатки или ганглиозных клеток в слое ганглиозных клеток сетчатки (RGC); (2) их аксонов в слое нервных волокон сетчатки (RNFL); и (3) снижения количества нейрональных синапсов, преимущественно во внутреннем плексиформном слое сетчатки.

Одобренные в настоящее время средства лечения глаукомы ограничиваются снижением внутриглазного давления (IOP). Обычно применяются хирургическое вмешательство, лазерное лечение или средства, снижающие IOP. Тем не менее, даже при высоком контроле IOP с помощью лекарственного средства или хирургического вмешательства многие пациенты с глаукомой продолжают испытывать прогрессирующую потерю зрения. В исследовании Collaborative Initial Glaucoma (CIGTS) пациентов с глаукомой рандомизировали для исходного лечения либо трабекулэктомией (хирургическое вмешательство), либо местными лекарственными препаратами. Несмотря на то, что в ходе исследования среднее значение IOP находилось в диапазоне от 17,1 до 18,3 мм рт.ст. в группе лечения лекарственным препаратом или от 13,8 до 14,4 мм рт.ст. в группе хирургического вмешательства, через 9 лет доля пациентов, у которых наблюдалось существенное ухудшение (3 дБ и более в среднем отклонении поля зрения Хамфри [HVF]), составила 23,1% и 34,1% соответственно. В клиническом исследовании Early Manifest Glaucoma пациентов рандомизировали для проведения аргоновой лазерной трабекулопластики в комбинации с топическими бета-блокаторами в сравнении с отсутствием лечения до тех пор, пока не наблюдалось прогрессирование. В группе, рандомизированной для начального лечения, у 45% пациентов в год 6 наблюдалось прогрессирование, на основе HVF или обследования зрительного нерва, несмотря на снижение IOP на 25% по сравнению с исходным уровнем. Эти данные свидетельствуют о значительной неудовлетворенной потребности в нейропротекторных видах лечения

пациентов, у которых контроль ИОР является недостаточным для предупреждения потери ганглиозных клеток, аксонов или синапсов, что приводит к прогрессирующей и необратимой потере зрения.

C1q распознает определенные патогены, модификации аутоантигенов, антигенсвязанные антитела или специфические молекулы на поверхности клеток. При нормальном старении C1q накапливается в синапсах, возможно, ослабленных возрастом или нервным стрессом, и различные патофизиологические стимулы могут запускать активацию классического каскада системы комплемента, что приводит к неадекватной элиминации синапсов. Этот аномальный воспалительный ответ, ассоциированный с удалением синапсов, называется комплемент-опосредованной нейродегенерацией (CMND). CMND связывают с болезнью Альцгеймера, шизофренией, болезнью Хантингтона, лобно-височной деменцией, спинальной мышечной атрофией и глаукомой. При дегенеративном стрессе в сетчатке активация C1q приводит к элиминации синапсов и способствует потере RGC и зрительного нерва. Повышение C1q и активация системы комплемента наблюдались в сетчатке человека с глаукомой, что было продемонстрировано протеомным анализом и гистологическим окрашиванием. Также сообщалось о CMND в моделях глаукомы у крыс, мышей и собак. В хронической спонтанной мышинной модели глаукомы (мыши DBA/2J) накопление C1q в сетчатке и потеря синапсов происходят на ранних стадиях заболевания; генетическая делеция C1q является защитной, значительно замедляя потерю RGC и дегенерацию зрительного нерва. Эти результаты были воспроизведены в другой мышинной модели, включающей острое повышение ИОР при инъекции микрогранул в переднюю камеру глаза; либо при генетической делеции C1q, либо фармакологическом ингибировании прямой инъекцией ингибитора системы комплемента в глаз, защищающем от потери нейронных клеток и дегенерации сетчатки. В другом исследовании изучалась дегенерация сетчатки после транзиторной ишемии, индуцированной кратковременным повышением ИОР, и также потеря RGC и истончение сетчатки улучшались у мышей с нокаутом C1q.

Возрастная макулодистрофия (AMD) является основной причиной слепоты во всем мире. GA, также известная как атрофическая AMD или запущенная сухая AMD, представляет собой запущенную форму AMD, приводящую к прогрессирующей и необратимой потере центральных фоторецепторов сетчатки, пигментного эпителия сетчатки и хориокапилляров, приводя к потере зрения. В настоящее время не существует одобренных видов лечения или средств терапии GA.

Система комплемента, по-видимому, генетически связана с AMD с полиморфизмами, идентифицированными в 6 различных белках, которые могут изменять активность пути системы комплемента. С помощью ингибирования взаимодействие связывающих мишень головок C1q, как и в случае с FabA, можно полностью ингибировать активность классического пути, оставляя лектиновый и альтернативный пути системы комплемента интактными. C1q/классический путь системы комплемента опосредует элиминацию нежелательных синапсов в процессе развития. У взрослых C1q

накапливается в синапсах с возрастом и заболеванием и может абберрантно запускать элиминацию, нейровоспаление и дегенерацию синапсов. Ингибирование C1q является защитным в многочисленных моделях нейродегенерации.

C1q, инициирующая молекула классического каскада системы комплемента, также участвует в инициации и распространении ГА. C1q накапливается с возрастом в двух отдельных и важных патологических процессах, ассоциированных с ГА, в синапсах фоторецепторных нейронов во внешнем плексиформном слое и в друзах. Увеличение размера и площади друз, представляющих собой внеклеточные скопления, состоящие из липидов и белков из наружных сегментов дегенерирующих фоторецепторных клеток, связано с риском развития AMD. Было показано, что активация как классического, так и альтернативного путей системы комплемента очевидна на внешних сегментах фоторецепторов и вызывает атрофию сетчатки при ГА. Абберрантная активность C1q/классического пути связана с потерей фоторецепторов в мышинной модели ГА, индуцированной фотоповреждением. Было продемонстрировано, что локальный C1q, продуцируемый микроглией/макрофагами сетчатки, является инициатором активации воспалительных процессов и воспаления. Ингибирование C1q сетчатки с помощью FabA в данной модели замедляло атрофию сетчатки, уменьшало потерю фоторецепторов, увеличивало толщину сетчатки и сохраняло функцию сетчатки. FabA представляет собой новый подход к лечению комплемент-опосредованной дегенерации сетчатки, включая ГА.

Все последовательности, упомянутые в настоящем изобретении, включены посредством ссылки из заявки на патент США №14/933517, заявки на патент США №14/890811, заявки на патент США №8877197, патента США №9708394, заявки на патент США №15/360549, патента США №9562106, патента США №10450382, патента США №10457745, международной заявки на патент №PCT/US2018/022462, каждое из которых включено в данный документ посредством ссылки для раскрытых в нем антигенов и связанных композиций.

Полноразмерные антитела могут быть получены с применением методик инженерии рекомбинантной ДНК. Такие сконструированные версии включают версии, созданные, например, из природных переменных областей антител с помощью вставок, делеций или изменений аминокислотных последовательностей природных антител. Конкретные примеры этого типа включают сконструированные домены переменной области, содержащие по меньшей мере одну CDR и необязательно одну или несколько каркасных аминокислот из одного антитела и остаток домена переменной области из второго антитела. ДНК, кодирующая антитело, может быть получена с помощью делетирования всей ДНК, кроме требуемой части, которая кодирует полноразмерное антитело. ДНК, кодирующая химеризованное антитело, может быть получена с помощью рекомбинации ДНК, кодирующей по сути или исключительно константные области человека, и ДНК, кодирующей переменные области, полученные по сути или исключительно из последовательности переменной области млекопитающего, отличного

от человека. ДНК, кодирующая гуманизированные антитела, может быть получена с помощью рекомбинации ДНК, кодирующей константные области и переменные области, отличные от определяющих комплементарность областей (CDR), полученных в основном или исключительно из соответствующих областей человеческого антитела, и ДНК, кодирующих CDR, полученных по сути или исключительно от млекопитающего, отличного от человека.

Подходящие источники молекул ДНК, кодирующих антитела, включают клетки, такие как гибридомы, которые экспрессируют полноразмерные антитела. Например, антитело может быть выделено из клетки-хозяина, которая экспрессирует вектор экспрессии, кодирующий тяжелую и/или легкую цепь антитела.

Фрагменты антител, включая без ограничения фрагменты Fab и/или производные антител, также могут быть получены с использованием методик рекомбинантной ДНК-инженерии, включающих манипуляции и повторную экспрессию ДНК, кодирующей переменные и константные области антител. Стандартные методики молекулярной биологии могут быть использованы для модификации, добавления или делетирования дополнительных аминокислот или доменов при необходимости. Любые изменения переменных или константных областей по-прежнему охватываются терминами «переменная» и «константная» области, как они используются в данном документе. В некоторых случаях ПЦР используется для создания фрагмента антитела с помощью введения стоп-кодона непосредственно после кодона, кодирующего межцепочечный цистеин C_H1, так что трансляция домена C_H1 останавливается на межцепочечном цистеине. Способы конструирования подходящих праймеров для ПЦР хорошо известны в данной области техники, и последовательности доменов C_H1 антител легко доступны. В некоторых вариантах осуществления стоп-кодона могут быть введены с использованием методик сайт-направленного мутагенеза.

Антитело по настоящему изобретению может быть получено из любого изотипа («класса») антитела, включая, например, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE и их подклассы, включая, например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В определенных предпочтительных вариантах осуществления тяжелая и легкая цепи антитела происходят из IgG. Тяжелые и/или легкие цепи антитела могут происходить из IgG мыши или IgG человека. В некоторых других предпочтительных вариантах осуществления тяжелая и/или легкая цепи антитела происходят из IgG1 человека. В других предпочтительных вариантах осуществления тяжелая и/или легкая цепи антитела происходят из IgG4 человека.

Антитело по настоящему изобретению может связываться с C1q, C1r или C1s и ингибировать их биологическую активность. Например, (1) связывание C1q с аутоантителом, (2) связывание C1q с C1r, (3) связывание C1q с C1s, (4) связывание C1q с фосфатидилсеринем, (5) связывание C1q с пентраксином-3, (6) связывание C1q с C-реактивным белком (CRP), (7) связывание C1q с глобулярным рецептором C1q (gC1qR), (8) связывание C1q с рецептором системы комплемента 1 (CR1), (9) связывание C1q с В-амилоидом или (10) связывание C1q с кальретикулином. В других

вариантах осуществления биологическая активность C1q представляет собой (1) активацию классического пути активации системы комплемента, (2) снижение лизиса и/или снижение отложения C3, (3) активацию антител и комплементзависимую цитотоксичность, (4) гемолиз CH50, (5) снижение лизиса эритроцитов, (6) снижение фагоцитоза эритроцитов, (7) снижение инфильтрации дендритных клеток, (8) ингибирование опосредованного комплементом лизиса эритроцитов, (9) уменьшение лимфоцитарной инфильтрации, (10) уменьшение макрофагальной инфильтрации, (11) уменьшение отложения антител, (12) уменьшение нейтрофильной инфильтрации, (13) снижение фагоцитоза тромбоцитов, (14) снижение лизиса тромбоцитов, (15) улучшение выживаемости трансплантата, (16) снижение опосредованного макрофагами фагоцитоза, (17) снижение опосредованной аутоантителами активации системы комплемента, (18) снижение разрушения эритроцитов вследствие трансфузионных реакций, (19) снижение лизиса эритроцитов вследствие аллоантител, (20) уменьшение гемолиза вследствие трансфузионных реакций, (21) уменьшение опосредованного аллоантителами лизиса тромбоцитов, (22) нормализацию анемии, (23) нормализацию эозинофилии, (24) снижение отложения C3 на эритроцитах (например, снижение отложения C3b, iC3b и т.д. на эритроцитах), (25) снижение отложения C3 на тромбоцитах (например, снижение отложения C3b, iC3b и т.д., на тромбоцитах), (26) снижение продуцирования анафилатоксинов, (27) снижение образования пузырей, опосредованного аутоантителами, (28) снижение индуцированной аутоантителами эритематозной болезни, (29) снижение разрушения эритроцитов вследствие трансфузионных реакций, (30) снижение лизиса тромбоцитов вследствие трансфузионных реакций, (31) снижение активации тучных клеток, (32) снижение высвобождения гистамина тучными клетками, (33) снижение сосудистой проницаемости, (34) снижение отложения комплемента на эндотелии трансплантата, (35) продуцирование антител В-клетками, (36) созревание дендритных клеток, (37) пролиферацию Т-клеток, (38) продуцирование цитокинов, (39) активацию микроглии, (40) реакцию Arthus, (41) снижение образования анафилатоксина в эндотелии трансплантата или (42) активацию клеток, экспрессирующих рецептор комплемента 3 (CR3/C3).

В некоторых вариантах осуществления гемолиз CH50 включает гемолиз CH50 человека, мыши и/или крысы. В некоторых вариантах осуществления антитело способно нейтрализовать от по меньшей мере около 50% до по меньшей мере около 95% гемолиза CH50. В некоторых вариантах осуществления антитело способно нейтрализовать 50%, 60%, 70%, 80, 90% или 100% гемолиза CH50. Антитело также может быть способно нейтрализовать по меньшей мере 50% гемолиза CH50 в дозе, составляющей менее 150 нг/мл, менее 100 нг/мл, менее 50 нг/мл или менее 20 нг/мл.

Другие анализы *in vitro* для измерения активности системы комплемента включают анализы ELISA для измерения продуктов расщепления компонентов системы комплемента или комплексов, которые образуются во время активации системы комплемента. Активацию системы комплемента классическим путем можно измерить,

отслеживая уровни C4d и C4 в сыворотке крови. Активацию альтернативного пути можно измерить с помощью ELISA путем оценки уровней комплексов Bb или C3bBbP в кровотоке. Анализ опосредованной антителами активации комплемента *in vitro* также можно использовать для оценки ингибирования продуцирования C3a.

Антитело по настоящему изобретению может представлять собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, рекомбинантное антитело, гуманизированное антитело, человеческое антитело, химерное антитело, полиспецифическое антитело, их фрагмент или их производное. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело.

Антитела по настоящему изобретению также могут представлять собой фрагмент антитела, такой как фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент F_v, диатело или молекулу одноцепочечного антитела. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab.

В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой человеческие моноклональные антитела, которые могут быть получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, такими как (a) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным по генам иммуноглобулина человека или полученная из них гибридома (описанная далее ниже), (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например, из трансфектомы, (c) антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных комбинаторных антител человека, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей человеческого зародышевого и/или незародышевого иммуноглобулина. Однако в определенных вариантах осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела могут быть подвергнуты мутагенезу *in vitro* (или, когда используется животное, трансгенное по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантные антитела представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека и связаны с ними, могут не существовать в природе в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой гуманизированные и/или химерные моноклональные антитела, которые можно получить с помощью иммунизации грызунов (например, мышей, крыс, хомяков и морских свинок) либо (1) нативным компонентом системы комплемента (например, C1q), полученным в результате ферментативного расщепления очищенного компонента комплемента из плазмы крови или сыворотки крови человека, либо (2) рекомбинантным компонентом системы комплемента или его производным фрагментом, экспрессированным либо

эукариотической, либо прокариотической системами. Для иммунизации можно использовать других животных, например, отличных от человека приматов, трансгенных мышей, экспрессирующих иммуноглобулины человека, и мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID), которым трансплантировали В-лимфоциты человека.

Поликлональные и моноклональные антитела вырабатываются естественным образом в виде молекул иммуноглобулина (Ig) в ответ иммунной системы на патоген. Преобладающий формат с концентрацией 8 мг/мл в сыворотке крови человека, молекула IgG1 ~150 кДа состоит из двух идентичных тяжелых цепей ~50 кДа и двух идентичных легких цепей ~25 кДа.

Гибридомы могут быть получены с помощью обычных процедур путем слияния В-лимфоцитов иммунизированных животных с клетками миеломы. Кроме того, антитела к C1q могут быть получены с помощью скрининга библиотек рекомбинантных одноцепочечных Fv или Fab из В-лимфоцитов человека в системе фагового дисплея. Специфичность МАб к C1q человека можно проверить с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), вестерн-иммуноблоттинга или других иммунохимических методик.

Ингибирующую активность антител, идентифицированных в процессе скрининга, в отношении активации системы комплемента можно оценить с помощью гемолитических анализов с использованием либо несенсибилизированных эритроцитов кролика или морской свинки для альтернативного пути системы комплемента, либо сенсибилизированных эритроцитов цыпленка или овцы для классического пути системы комплемента. Те гибридомы, которые демонстрируют ингибирующую активность, специфическую для классического пути системы комплемента, клонируют с помощью предельного разведения. Антитела очищают для характеристики специфичности к C1q человека с помощью анализов, описанных выше.

Определения

Используемые в данном документе формы единственного числа могут означать один или несколько. Используемые в данном документе в пункте(ах) формулы изобретения, при использовании в сочетании со словом «содержащий», формы единственного числа могут означать один или более чем один. Например, ссылка на «антитело» представляет собой ссылку на от одного до многих антител. Используемый в данном документе термин «другой» может означать по меньшей мере второй или более.

Используемый в данном документе термин «*введение совместно*» с другим соединением или композицией включает одновременное введение и/или введение в разное время. Совместное введение также включает введение в виде совместного состава или введение в виде отдельных композиций, в том числе с различными частотами или интервалами введения, а также с использованием одного и того же пути введения или разных путей введения.

Термин «*иммуноглобулин*» (Ig) используется в данном документе взаимозаменяемо

с термином «*антитело*». Термин «антитело» используется в данном документе в самом широком смысле и конкретно охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), образованные по меньшей мере из двух интактных антител, фрагменты антител, если они демонстрируют биологическую активность, и производные антител.

Основная 4-цепочечная единица антитела представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Спаривание V_H и V_L вместе образует один антигенсвязывающий сайт. Для получения информации о структуре и свойствах различных классов антител, см, например, Basic and Clinical Immunology, 8th Ed., Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6.

L-цепь от любых вида позвоночных может быть отнесена к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа («κ») и лямбда («λ»), на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей (CH) иммуноглобулины можно отнести к разным классам или изотипам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, тяжелые цепи которых обозначены альфа («α»), дельта («δ»), эpsilon («ε»), гамма («γ») и мю («μ»), соответственно. Классы γ и α дополнительно делятся на подклассы (изотипы) на основе относительно незначительных различий в последовательности и функции CH, например, у человека экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны и в целом описаны, например, в Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology, 4th ed. (W.B. Saunders Co., 2000).

«*Полноразмерные антитела*», как правило, представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины массой около 150000 дальтон, содержащие две идентичные легкие (L) цепи и две идентичные тяжелые (H) цепи. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, в то время как количество дисульфидных связей варьируется среди тяжелых цепей разных изотипов иммуноглобулинов. Каждая тяжелая и легкая цепь также содержит расположенные на равном расстоянии друг от друга внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце переменный домен (V_H), за которым следует ряд константных доменов. Каждая легкая цепь имеет переменный домен на одном конце (V_L) и константный домен на другом конце; константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, а переменный домен легкой цепи выровнен с переменным доменом тяжелой цепи. Считается, что конкретные аминокислотные остатки образуют область контакта между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи.

«*Выделенная*» молекула или клетка представляет собой молекулу или клетку, которые идентифицированы и отделены, по меньшей мере, от одной контаминирующей

молекулы или клетки, с которыми они, как правило, связаны в среде, в которой они были произведены. Предпочтительно, выделенная молекула или клетка не имеет связей со всеми компонентами, ассоциированными со средой, в которой они культивируются. Выделенная молекула или клетка имеют форму, отличную от той формы или состояния, в которых они находятся в природе. Таким образом, выделенные молекулы отличаются от молекул, существующих в природе в клетках; выделенные клетки отличаются от клеток, существующих в природе в тканях, органах или у индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула представляет собой антитело к C1q по настоящему изобретению. В других вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой клетку-хозяина или клетку гибридомы, продуцирующую антитело к C1q по настоящему изобретению.

«Выделенное» антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано, выделено и/или извлечено из компонента среды его продуцирования (например, естественным путем или рекомбинантно). Предпочтительно выделенный полипептид не ассоциирован со всеми другими контаминирующими компонентами из среды его продуцирования. Контаминирующие компоненты из среды их продукции, например, полученные из рекомбинантно трансфицированных клеток, представляют собой материалы, которые, как правило, мешают исследованиям, диагностике или терапевтическому применению антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В определенных предпочтительных вариантах осуществления антитело будет очищено: (1) до более 95% по массе антитела, как определено, например, методом Лоури, и в некоторых вариантах осуществления до более 99% по массе; (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности, используя секвенатор с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности с помощью SDS-PAGE-электрофореза в невозстанавливающих или восстанавливающих условиях с использованием Кумасси синего или, предпочтительно, красителя на основе серебра. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных T-клетках, поскольку по меньшей мере один компонент естественной среды антитела будет отсутствовать. В то же время, однако, выделенный полипептид или антитело как правило, будут получены с помощью способа, включающего по меньшей мере одну стадию очистки.

«Варибельная область» или «варибельный домен» антитела относится к аминоконцевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Варибельные домены тяжелой цепи и легкой цепи можно обозначать как «V_H» и «V_L» соответственно. Эти домены в целом являются наиболее варибельными частями антитела (по сравнению с другими антителами того же класса) и содержат сайты связывания антигена.

Термин «варибельный» относится к тому факту, что определенные сегменты варибельных доменов сильно отличаются по последовательности среди разных антител. V-домен опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела к его конкретному антигену. В то же время, варибельность неравномерно

распределена на протяжении переменных доменов. Вместо этого она сосредоточена в трех сегментах, называемых гиперпеременными областями (HVR), как в переменных доменах легкой цепи, так и в переменных доменах тяжелой цепи. Более консервативные фрагменты переменных доменов называются каркасными областями (FR). Каждый из переменных доменов нативных тяжелой и легкой цепей состоит из четырех областей FR, в значительной степени принимающих конфигурацию бета-листа, соединенных тремя HVR, которые образуют петли, соединяющие и в некоторых случаях образующие часть структуры бета-листа. HVR в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью областей FR и вместе с HVR из другой цепи, участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Константные домены не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной токсичности.

Используемый в данном документе термин «CDR» или «определяющая комплементарность область» предназначен для обозначения несмежных антигенсвязывающих сайтов, которые находятся внутри переменной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепей. CDR были описаны Kabat et al., *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616 (1977); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, “*Sequences of proteins of immunological interest*” (1991) (также упоминается в данном документе как Kabat 1991); Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) (также упоминается в данном документе как Chothia 1987); и MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996), где определения включают перекрывающиеся аминокислотные остатки или их подмножества при сравнении друг с другом. Тем не менее, применение любого из определений для обозначения CDR антитела, или привитых антител, или их вариантов охватываются в пределах объема указанного термина в соответствии с обозначением и использованием в настоящем документе.

Как используется в данном документе, термины «CDR-L1», «CDR-L2» и «CDR-L3» относятся соответственно к первой, второй и третьей CDR переменной области легкой цепи. Как используется в данном документе, термины «CDR-H1», «CDR-H2» и «CDR-H3» относятся соответственно к первой, второй и третьей CDR переменной области тяжелой цепи. Как используется в данном документе, термины «CDR-1», «CDR-2» и «CDR-3» относятся соответственно к первой, второй и третьей CDR переменной области любой из цепей.

Используемый в данном документе термин «*моноклональное антитело*» относится к антителу, полученному из популяции по сути гомогенных антител, т.е., отдельные антитела популяции, идентичны, за исключением возможных естественных мутаций (например, изомеризации, амидирования), которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, при этом они направлены против одного антигенного сайта. В отличие от препаратов

поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. В дополнение к своей специфичности, моноклональные антитела предпочтительны, поскольку они, как правило, синтезируются гибридной культурой, неконтаминированной другими иммуноглобулинами. Модификатор «моноклональное» указывает на характер антитела, как полученного из по сути гомогенной популяции антител, и его не стоит воспринимать как требующий получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, применяемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены с помощью различных методик, включая, например, метод гибридомы (например, Kohler and Milstein., *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3):253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2d ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), методы рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567), технологии на основе фагового дисплея (см., например, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 101(34):12467-472 (2004); и Lee et al., *J. Immunol. Способы* 284(1-2):119-132 (2004), и технологии получения человеческих или человекоподобных антител у животных, которые имеют части или все локусы иммуноглобулинов человека или гены, кодирующие последовательности иммуноглобулинов человека (см., например, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); патенты США №№ 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; и 5661016; Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14:826 (1996); и Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995).

Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «целое антитело» используются взаимозаменяемо для обозначения антитела в его по сути интактной форме, в отличие от фрагмента антитела или производного антитела. В частности, полные антитела включают антитела с тяжелыми и легкими цепями, включая Fc-область. Константные домены могут представлять собой константные домены с нативной последовательностью (например, константные домены человеческой с нативной последовательностью) или их варианты аминокислотной последовательности. В некоторых случаях интактное антитело может выполнять одну или более эффекторных функций.

«Фрагмент антитела» или «антигенсвязывающий фрагмент» или «функциональные фрагменты» антител включают часть интактного антитела, предпочтительно антигенсвязывающую и/или переменную область интактного антитела

или F-область антитела, которая сохраняет или имеет модифицированную способность связывания FcR. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; и линейные антитела (см. патент США 5641870, пример 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)). Дополнительные примеры фрагментов антител включают производные антител, такие как молекулы одноцепочечных антител, моновалентные антитела и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

«Производное антитела» представляет собой любую конструкцию, которая содержит антигенсвязывающую область антитела. Примеры производных антител включают молекулы одноцепочечных антител, моновалентные антитела и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

При расщеплении антител папаином образуются два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемые фрагментами «Fab», и остаточный фрагмент «Fc», название которого отражает его способность к легкой кристаллизации. Фрагмент Fab состоит из целой L-цепи вместе с доменом варибельной области H-цепи (V_H) и первым константным доменом одной тяжелой цепи (C_{H1}). Каждый фрагмент Fab является моновалентным по отношению к связыванию антигена, то есть он имеет единственный антигенсвязывающий сайт. Обработка антитела пепсином позволяет выделить одиночный большой фрагмент F(ab')₂, который приблизительно соответствует двум фрагментам Fab, и все еще способным к сшиванию антигена. Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab тем, что имеют несколько дополнительных остатков на C-конце домена C_{H1}, включая один или более цистеинов из шарнирной области антитела. В данном документе Fab'-SH является обозначением для фрагмента Fab', в котором цистеиновые остатки(-ок) константных доменов несут свободную тиольную группу. Фрагменты F(ab')₂ антитела первоначально получали в виде пар фрагментов Fab' с шарнирными цистеинами между ними. Также известны другие химические соединения фрагментов антитела.

Fc-фрагмент включает C-концевые части обеих H-цепей, удерживаемые вместе дисульфидами. Эффекторные функции антител определяются последовательностями в Fc-области, области, которая также распознается Fc-рецепторами (FcR), обнаруженными на определенных типах клеток.

Термин «Fc-область» в данном документе используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая Fc-области с нативной последовательностью и варианты Fc-областей. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG обычно определяют как участок от аминокислотного остатка в позиции Cys226 или от Pro230 до его карбокси-конца. C-концевой лизин (остаток 447 в соответствии с системой нумерации EU) Fc-области может быть удален, например, во время получения или очистки антитела, или путем рекомбинантного конструирования нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. Соответственно, композиция интактных антител может

содержать популяции антител, в которых удалены все остатки К447, популяции антител, в которых не удалены остатки К447, и популяции антител, содержащие смесь из антител с остатком К447 и без него. Подходящие Fc-области с нативной последовательностью для применения в антителах по настоящему изобретению включают области из человеческих IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

«Fc-область с нативной последовательностью» содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-области, встречающейся в природе. Нативная последовательность Fc-областей человека включают нативную последовательность Fc-области IgG1 человека (аллотипы не А и А); нативную последовательность Fc-области IgG2 человека; нативную последовательность Fc-области IgG3 человека; и нативную последовательность Fc-области IgG4 человека, а также существующие в природе варианты указанных последовательностей.

«Вариантная Fc-область» содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности Fc-области с нативной последовательностью на основании по меньшей мере одной модификации аминокислоты, предпочтительно одной или более аминокислотных замен(-ы). Предпочтительно вариантная Fc-область имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с Fc-областью с нативной последовательностью или с Fc-областью исходного полипептида, например, от около одной до около десяти аминокислотных замен, и предпочтительно от около одной до около пяти аминокислотных замен в Fc-области с нативной последовательностью или в Fc-области исходного полипептида. Вариант области Fc по настоящему изобретению предпочтительно будет характеризоваться по меньшей мере приблизительно 80% гомологией с нативной последовательностью области Fc и/или с областью Fc исходного полипептида, и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% гомологией с ними, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95% гомологией с ними.

Термины «Fc-рецептор» или «FcR» описывают рецептор, который связывается с Fc-областью антитела. Предпочтительный FcR представляет собой нативную последовательность человеческого FcR. Более того, предпочтительным FcR является тот, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов, рецепторы FcγRII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, отличающиеся преимущественно их цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив («ITAM») в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит мотив ингибирования на основе тирозина иммунорецептора (ITIM) в своем цитоплазматическом домене (см., например, M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Обзор FcR приведен в публикациях Ravetch and Kinetic, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel et

al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Другие FcR, включая те, которые будут идентифицированы в будущем, включены в термин «FcR» в данном документе. FcR также могут увеличивать время полужизни антител в сыворотке крови.

Связывание с FcRn *in vivo* и время полужизни в сыворотке крови полипептидов, связывающих с высокой аффинностью человеческий FcRn, можно проанализировать, например, у трансгенных мышей, или в трансфицированных человеческих линиях клеток, экспрессирующих FcRn человека, или у приматов, которым вводят полипептиды с вариантной Fc-областью. В WO 2004/42072 (Presta) описаны варианты антител с улучшенным или ослабленным связыванием с FcR. *См. также, например, Shields et al., J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

«Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный сайт распознавания и связывания антигена. Этот фрагмент состоит из димера одного домена вариабельного области тяжелой цепи и одного домена вариабельной области легкой цепи, жестко связанных посредством нековалентных связей. При фолдинге этих двух доменов наружу выступают шесть гипервариабельных петель (по 3 петли на каждой H- и L-цепи), аминокислотные остатки которых участвуют в связывании антигена и придают антителу специфичность по отношению к связыванию антигена. В то же время даже один вариабельный домен (или половина Fv, содержащая только три HVR, специфичные к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя с более низкой аффинностью, чем целый сайт связывания.

«Одноцепочечные Fv», также имеющие аббревиатуру «sFv» или «scFv», представляют собой фрагменты антител, которые содержат домены антител V_H и V_L, связанные в одну полипептидную цепь. Предпочтительно, полипептид sFv также содержит полипептидный линкер между доменами V_H и V_L, позволяющий sFv образовывать структуру, необходимую для связывания с антигеном. Обзор по sFv см. у Plückthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

Термин «диатела» относится к небольшим фрагментам антител, полученным путем конструирования фрагментов sFv (см. предыдущий абзац) с короткими линкерами (около 5-10 остатков) между доменами V_H и V_L, благодаря чему достигается межцепочечное, а не внутрицепочечное сопряжение V-доменов, приводящее к образованию бивалентного фрагмента, т.е. фрагмента, имеющего два антигенсвязывающих сайта. Биспецифические диатела представляют собой гетеродимеры двух «кроссоверных» фрагментов sFv, в которых домены V_H и V_L двух антител присутствуют на разных полипептидных цепях. Более подробно диатела описаны, например, в EP 404097; WO 1993/011161; WO/2009/121948; WO/2014/191493; Hollinger et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:6444-48 (1993).

Используемый в данном документе термин «химерное антитело» относится к антителу (иммуноглобулину), в котором часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или

гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих от определенного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, а остальная часть цепи (цепей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагментам таких антител при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность (патент США № 4816567; Morrison et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:6851-55 (1984)). Представляющие интерес химерные антитела включают антитела PRIMATIZED[®], в которых антигенсвязывающая область антитела происходит из антитела, получаемого, например, при помощи иммунизации макака представляющим интерес антигеном. Используемый в данном документе термин «гуманизованное антитело» означает подмножество «химерных антител».

«Гуманизованные» формы отличных от человеческих (например, мышинных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из отличного от человеческого иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело представляет собой человеческий иммуноглобулин (антитело-реципиент), в котором остатки из HVR реципиента заменены остатками из HVR отличного от человека вида (антитело-донор), такого как мышь, крыса, кролик или отличный от человека примат, имеющий требуемую специфичность, аффинность и/или активность. В некоторых случаях, остатки FR человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими отличными от человеческих остатками. Кроме того, гуманизованные антитела могут содержать остатки, отсутствующие в антителе-реципиенте или в антителе-доноре. Эти модификации могут быть сделаны для дополнительного улучшения характеристик антител, таких как аффинность связывания. В общем, гуманизованное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или практически все гиперпеременные петли соответствуют таковым последовательности отличного от человеческого иммуноглобулина, и все или практически все области FR соответствуют таким областям последовательности человеческого иммуноглобулина, хотя области FR могут содержать одну или более отдельных замен остатков FR, которые улучшают характеристики антитела, такие как аффинность связывания, изомеризация, иммуногенность и т.п. Число этих аминокислотных замен в FR обычно составляет не более 6 в H-цепи, а в L-цепи не более 3. Гуманизованное антитело необязательно будет также содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Для получения дополнительной информации, см., например, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). См. также, например, Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurler and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); и патенты США №№ 6982321 и 7087409.

«Человеческое антитело» представляет собой антитело, которое имеет аминокислотную последовательность, соответствующую таковой из антитела, вырабатываемого человеком, и/или была создана с помощью любых технологий получения человеческих антител, описанных в данном документе. Из этого определения человеческого антитела, в частности, исключено гуманизованное антитело, содержащее отличные от человеческих антигенсвязывающие остатки. Антитела человека можно получать различными способами, известными в данной области техники, включая библиотеки фагового дисплея. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Также для получения моноклональных антител человека доступны способы, описанные в Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). *См. также* van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001). Человеческие антитела могут быть получены путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для выработки таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, но чьи эндогенные локусы были инактивированы, например, иммунизированным ксеномышам (см., например, патенты США №№ 6075181 и 6150584 относительно технологии XENOMOUSE™). *См. также*, например, Li et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) относительно антител человека, полученных с помощью технологии человеческой В-клеточной гибридомы.

Используемый в данном документе термин «гипервариабельная область», «HVR» или «HV» относится к областям вариабельной области антитела, которые являются гипервариабельными по последовательности, и/или образующим структурно определенные петли. В целом, антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). В нативных антителах H3 и L3 демонстрируют наибольшее разнообразие из шести HVR, и, как полагают, в частности, H3 играет уникальную роль в придании высокой специфичности антителам. *См., например*, Xu et al., *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson and Wu в *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)). Действительно, встречающиеся в природе антитела верблюдовых, состоящие только из тяжелой цепи, являются функциональными и стабильными без легкой цепи. *См., например*, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993) and Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Применяют большое число вариантов разграничения HVR, которые включены в данный документ. HVR, которые являются определяющими комплементарность областями (CDR) по Kabat, основаны на вариабельности последовательностей и наиболее часто используются (Kabat et al., *выше*). Вместо этого Chothia ссылается на расположение структурных петель (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). HVR по AbM представляют собой компромиссный вариант между CDR по Kabat, и структурными петлями по Chothia, и используются в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM. HVR по «Contact» определяют в анализе доступных кристаллических структур комплексов. Остатки из каждой из этих HVR приведены ниже.

Петля	Kabat	AbM	Chothia	Contact
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34	L26-L32 L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L50-L52 L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L91-L96 L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (нумерация по Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (нумерация по Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

HVR могут включать «расширенные HVR» следующим образом: 24-36 или 24-34 (L1), 46-56 или 50-56 (L2), и 89-97 или 89-96 (L3) в VL, и 26-35 (H1), 50-65 или 49-65 (предпочтительный вариант) (H2) и 93-102, 94-102 или 95-102 (H3) в VH. Остатки варибельного домена пронумерованы согласно Kabat et al., выше, для каждого из этих определений расширенного HVR.

Остатки «каркасной области» или «FR» представляют собой остатки варибельного домена, отличные от остатков HVR, как определено в данном документе.

Фраза «нумерация остатков варибельных доменов, как в Kabat» или «нумерация аминокислотных положений, как в Kabat», и их варианты относятся к системе нумерации, используемой для варибельных доменов тяжелой цепи или варибельных доменов легкой цепи при составлении антител в Kabat et al., выше. При использовании этой системы нумерации, фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньше или больше аминокислот, что соответствует укорочению или вставкам в FR или HVR варибельного домена. Например, варибельный домен тяжелой цепи может содержать вставку одной аминокислоты (остаток 52a в соответствии с Kabat) после остатка 52 H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b, 82c и т. д. в соответствии с Kabat) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерация остатков по Kabat может быть определена для данного антитела путем выравнивания областей гомологии в последовательности антитела со «стандартной» пронумерованной по Kabat последовательностью.

Система нумерации согласно Kabat обычно используется для обозначения остатка в варибельном домене (примерно остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). «Система нумерации EU» или «индекс EU» в общем случае используется для обозначения остатка в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, индекс EU, описанный в Kabat et al., выше). «Индекс EU в соответствии с Kabat» относится к нумерации остатков EU человеческого антитела IgG1. Если не указано иначе, ссылки на номера остатков в варибельном домене антител означают нумерацию остатков по системе нумерации по

Kabat. Если не указано иное, то в данном документе ссылки на номера остатков в константном домене антител означают нумерацию остатков согласно системе нумерации EU (например, см. публикацию патента США № 2010-280227).

«*Акцепторная каркасная область человека*», как используется в данном документе, представляет собой каркасную область, содержащую аминокислотную последовательность каркасной области VL или VH, полученную из каркасной области иммуноглобулина человека или консенсусной каркасной области человека. Акцепторная каркасная область человека, «полученная из» каркасной области иммуноглобулина человека или консенсусной каркасной области человека, может содержать такую же аминокислотную последовательность, или она может содержать ранее существовавшие изменения аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления количество ранее существовавших аминокислотных замен составляет 10 или меньше, 9 или меньше, 8 или меньше, 7 или меньше, 6 или меньше, 5 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше, или 2 или меньше. Если в VH присутствуют ранее существовавшие аминокислотные изменения, предпочтительно, эти изменения осуществляют только в трех, двух или одном из положений 71H, 73H и 78H; например, аминокислотные остатки в этих положениях могут представлять собой 71A, 73T и/или 78A. В некоторых вариантах осуществления человеческая акцепторная каркасная область VL идентична по последовательности с последовательностью каркасной области VL человеческого иммуноглобулина или последовательностью человеческой консенсусной каркасной области.

«*Консенсусная каркасная область человека*» представляет собой каркасную область, которая содержит наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки при выборе последовательностей каркасной области VL или VH иммуноглобулина человека. Обычно набор последовательностей VL или VH человеческого иммуноглобулина получают из подгруппы последовательностей переменных доменов. В целом, подгруппа последовательностей представляет собой подгруппу, как в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Примеры включают для VL, подгруппа может представлять собой подгруппу каппа I, каппа II, каппа III или каппа IV, как в Kabat et al., *выше*. Кроме того, для VH подгруппа может представлять собой подгруппу I, подгруппу II или подгруппу III, как в Kabat et al., *выше*.

«*Аминокислотная модификация*» в определенном положении относится к замене или делеции указанного остатка или вставке по крайней мере одного аминокислотного остатка, примыкающего к указанному остатку. Вставка «рядом» с указанным остатком означает вставку в пределах одного-двух его остатков. Вставка может быть N-концевой или C-концевой по отношению к указанному остатку. В данном документе предпочтительной модификацией аминокислоты является замещение.

Антитело с «*созревшей аффинностью*» представляет собой антитело с одним или несколькими изменениями в одном или более его HVR, которые приводят к повышению

аффинности антитела к антигену по сравнению с исходным антителом, не имеющим этих изменений. В некоторых вариантах осуществления антитело с созревшей аффинностью имеет наномолярную или даже пикомолярную аффинность к антигену-мишени. Антитела с созревшей аффинностью получают способами, известными в данной области техники. Например, в Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) описано созревание аффинности путем перестановки доменов VH и VL. Случайный мутагенез HVR и/или каркасных остатков описывается, например, в Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); и Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Используемый в данном документе термин «*специфически распознает*» или «*специфично связывается*» относится к измеримым и воспроизводимым взаимодействиям, таким как притяжение или связывание между мишенью и антителом, которое определяет присутствие цели в присутствии гетерогенной популяции молекулы, включая биологические молекулы. Например, антитело, которое специфично или предпочтительно связывается с мишенью или эпитопом, представляет собой антитело, которое связывается с этой мишенью или эпитопом с большей аффинностью, авидностью, с большей готовностью и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими мишенями или другими эпитопами мишени. Также понятно, что, например, антитело (или фрагмент), которое специфично или предпочтительно связывается с первой мишенью, может или не может специфично или предпочтительно связываться со второй мишенью. В частности, термин «*специфическое связывание*» или «*предпочтительное связывание*» необязательно включает (хотя может включать) исключительное связывание. Антитело, которое специфично связывается с мишенью, может иметь константу ассоциации, равную по меньшей мере около 10^3 M^{-1} или 10^4 M^{-1} , иногда около 10^5 M^{-1} или 10^6 M^{-1} , в других случаях около 10^6 M^{-1} или 10^7 M^{-1} , от около 10^8 M^{-1} до 10^9 M^{-1} , или от около 10^{10} M^{-1} до 10^{11} M^{-1} или выше. Для выбора антител, специфически иммунореактивных по отношению к конкретному белку, можно использовать различные форматы иммуноанализа. Например, твердофазные иммуноферментные анализы ИФА, как правило, используется для выбора моноклональных антител, специфически иммунореактивных по отношению к белку. См., например, Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York, для описания форматов иммуноанализа и условий, которые могут быть использованы для определения специфической иммунореактивности.

Используемый в данном документе термин «*идентичность*», означает, что в любом конкретном положении в выровненных последовательностях аминокислотный остаток идентичен между последовательностями. Используемый в данном документе термин «*сходство*» указывает на то, что в любом конкретном положении в выровненных последовательностях аминокислотный остаток имеет аналогичный тип между последовательностями. Например, лейцин может быть замещен изолейцином или

валином. Другие аминокислоты, которые часто могут замещать друг друга, включают без ограничения:

- фенилаланин, тирозин и триптофан (аминокислоты, имеющие ароматические боковые цепи);
- лизин, аргинин и гистидин (аминокислоты, имеющие основные боковые цепи);
- аспарат и глутамат (аминокислоты, имеющие кислые боковые цепи);
- аспарагин и глутамин (аминокислоты, имеющие амидные боковые цепи); и
- цистеин и метионин (аминокислоты, имеющие серосодержащие боковые цепи).

Степени идентичности и сходства могут быть легко вычислены. (См., например, Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; и Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991)

Используемый в данном документе термин «*взаимодействие*» между белком системы комплемента и вторым белком включает без ограничения белок-белковое взаимодействие, физическое взаимодействие, химическое взаимодействие, связывание, ковалентное связывание и ионное связывание. Используемое в данном документе антитело «ингибирует взаимодействие» между двумя белками, если антитело нарушает, уменьшает или полностью устраняет взаимодействие между двумя белками. Антитело по настоящему изобретению или его фрагмент «ингибирует взаимодействие» между двумя белками, когда антитело или его фрагмент связывается с одним из двух белков.

«*Блокирующее*» антитело, «*антагонистическое*» антитело, «*ингибирующее*» антитело или «*нейтрализующее*» представляет собой антитело, которое ингибирует или снижает одну или несколько биологических активностей антигена, с которым оно связывается, например, взаимодействия с одним или несколькими белками. В некоторых вариантах осуществления блокирующие антитела, антагонистические антитела, ингибирующие антитела или «*нейтрализующие*» антитела по сути или полностью ингибируют одну или несколько биологических активностей или взаимодействий антигена.

Термин «ингибитор» относится к соединению, обладающему способностью ингибировать биологическую функцию биомолекулы-мишени, например, mRNA или белка, путем снижения активности или экспрессии биомолекулы-мишени. Ингибитор может представлять собой антитело, малую молекулу или молекулу нуклеиновой кислоты. Термин «антагонист» относится к соединению, которое связывается с рецептором и блокирует или ослабляет биологический ответ рецептора. Термин «ингибитор» может также относиться к «антагонисту».

«*Эффекторные функции*» антитела относятся к той биологической активности, которая относится к Fc-области (например, нативной последовательности Fc-области или

варианту аминокислотной последовательности Fc-области) антитела, и варьируются в зависимости от изотипа антитела.

Используемый в данном описании, термин «аффинность» относится к равновесной константе для обратимого связывания двух средств (например, антитела и антигена) и выражается в виде константы диссоциации (KD). Аффинность может быть по меньшей мере в 1 раз большей, по меньшей мере в 2 раза большей, по меньшей мере в 3 раза большей, по меньшей мере в 4 раза большей, по меньшей мере в 5 раз большей, по меньшей мере в 6 раз большей, по меньшей мере в 7 раз большей, по меньшей мере в 8 раз большей, по меньшей мере в 9 раз большей, по меньшей мере в 10 раз большей, по меньшей мере в 20 раз большей, по меньшей мере в 30 раз большей, по меньшей мере в 40 раз большей, по меньшей мере в 50 раз большей, по меньшей мере в 60 раз большей, по меньшей мере в 70 раз большей, по меньшей мере в 80 раз большей, по меньшей мере в 90 раз большей, по меньшей мере в 100 раз большей или по меньшей мере в 1000 раз большей или более, чем аффинность антитела для несвязанных аминокислотных последовательностей. Аффинности антитела к белку-мишени может составлять, например, от около 100 нМ (нМ) до около 0,1 нМ, от около 100 нМ до около 1 пикомоль (пМ), или от около 100 нМ до около 1 фемтомоль (фМ) или более. Используемый в данном описании, термин «авидность» относится к сопротивлению комплексов двух или более средств диссоциировать после разбавления. Термины «иммунореактивный» и «преимущественно связывается» используются в данном документе взаимозаменяемо по отношению к антителам и/или их антигенсвязывающим фрагментам.

Термин «связывание» относится к непосредственной ассоциации двух молекул вследствие, например, ковалентного, электростатического, гидрофобного и ионного взаимодействия и/или взаимодействия с водородными связями, включая такие виды взаимодействия, как солевые мостики и водные мостики. Например, рассматриваемое антитело к C1q специфично связывается с эпитопом в белке системы комплемента C1q. Термин «специфическое связывание» относится к связыванию с аффинностью по меньшей мере 10^{-7} М или больше, например, 5×10^{-7} М, 10^{-8} М, 5×10^{-8} М и больше. Термин «неспецифическое связывание» относится к связыванию с аффинностью меньше чем около 10^{-7} М, например, к связыванию с аффинностью 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М и т.д.

Термин « k_{on} », используемый в данном документе, предназначен для обозначения константы скорости ассоциации антитела с антигеном.

Термин « k_{off} », используемый в данном документе, предназначен для обозначения константы скорости диссоциации антитела от комплекса антитело/антиген.

Термин « K_D », используемый в данном документе, предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации взаимодействия антитело-антиген.

Используемые в данном документе термины «процент (%) идентичности аминокислотных последовательностей» и «гомология» в отношении последовательности пептида, полипептида или антитела относится к проценту аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в

конкретной пептидной или полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения наибольшего процента идентичности последовательности и не считая любые консервативные замены частью идентичности последовательности. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотных последовательностей может быть выполнено различными способами, известными специалисту в данной области техники, например, с помощью общедоступного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN или MEGALIGN™ (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить нужные параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, известные в данной области техники, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

Термин «биологический образец» охватывает множество типов образцов, полученных от индивидуума, и может использоваться в диагностических или мониторинговых исследованиях. Определение охватывает образцы крови и других биологических жидкостей, образцы солидной ткани, такие как биоптат, культуры тканей или полученные из них клетки, а также их потомство. Термин также включает в себя образцы, с которыми были произведены какие-либо манипуляции после их получения, например, обработка реагентами, солюбилизация или обогащение определенными компонентами, такими как полинуклеотиды. Термин «биологический образец» охватывает клинический образец, а также включает в себя клетки в культуре, клеточные супернатанты, клеточные лизаты, сыворотку крови, плазму крови, биологическую жидкость и образцы ткани. Термин «биологический образец» включает в себя образцы мочи, слюны, спинномозговой жидкости, интерстициальной жидкости, внутриглазной жидкости, синовиальной жидкости, фракций крови, таких как плазма крови и сыворотка крови, и т. п. Термин «биологический образец» также включает в себя образцы солидной ткани, образцы культуры тканей и клеточные образцы.

«Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена по меньшей мере от одной загрязняющей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно ассоциирована в среде, в которой она была произведена. Предпочтительно, выделенная нуклеиновая кислота не имеет связей со всеми компонентами, ассоциированными со средой, в которой она культивируется. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды и антитела по настоящему изобретению, находятся в форме, отличной от той формы или условий, в которых они встречаются в природе. Поэтому выделенные молекулы нуклеиновой кислоты отличаются от нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды и антитела в данном документе, которые присутствуют в природе в клетках.

Используемый в данном документе термин «вектор» предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая относится к кольцевой двухцепочечной ДНК, в которую могут быть лигированы

дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой фаговый вектор. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, причем дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Определенные векторы способны к независимой репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную природу репликации и эписомные векторы млекопитающего). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут интегрироваться в геном клетки-хозяина после внесения в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, определенные векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в данном документе «рекомбинантными векторами экспрессии» или просто «векторами экспрессии». В целом, векторы экспрессии, используемые в технологиях рекомбинантных ДНК, часто находятся в форме плазмид. В настоящем описании «плазида» и «вектор» могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора.

Взаимозаменяемо употребляемые в данном документе термины «*полинуклеотид*» или «*нуклеиновая кислота*» относятся к полимерам нуклеотидов любой длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания и/или их аналоги, или любой субстрат, который может быть включен в полимер ДНК- или РНК-полимеразой или с помощью синтетической реакции. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Если присутствует, модификация нуклеотидной структуры может быть внесена до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может содержать модификацию(-и), произведенную(ые) после синтеза, такую(ие) как конъюгация с меткой. Другие типы модификаций включают, например, «кэп», замену одного или более встречающихся в природе нуклеотидов аналогом, межнуклеотидные модификации, такие как, например, модификации с незаряженными связями (например, метилфосфонаты, фосфотриэфиры, фосфоамидаты, карбаматы и т. д.) и с заряженными связями (например, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты и т. д.), модификации, содержащие боковые части, такие как, например, белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, *p*ly-L-лизин и т. д.), модификации, содержащие интеркаляторы (например, акридин, псорален и т. д.), модификации, содержащие хелаторы (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, окислительные металлы и т.д.), модификации, содержащие алкилирующие средства, модификации с модифицированными связями (например, альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и др.), а также немодифицированные формы полинуклеотида(-ов). Кроме того, любые гидроксильные группы, как правило, присутствующие в сахарах, могут быть заменены, например, фосфонатными группами, фосфатными группами, защищены стандартными защитными группами или активированы для получения дополнительных

связей с дополнительными нуклеотидами, или могут быть конъюгированы с твердыми или полутвердыми подложками. 5'- и 3'-концевые ОН могут быть фосфорилированы или замещены аминами или фрагментами органической кэппирующей группы, содержащей от 1 до 20 атомов углерода. Другие гидроксилы также могут быть преобразованы в стандартные защитные группы. Полинуклеотиды могут также содержать аналогичные формы сахаров рибозы или дезоксирибозы, которые, как правило, известны в данной области техники, включая, например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил-, 2'-фтор- или 2'-азидо-рибозу, карбоциклические аналоги сахаров, α -аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, пираноз, фураноз, седогептулозы, ациклические аналоги и основные аналоги нуклеозидов, такие как метилрибозид. Одна или несколько фосфодиэфирных связей могут быть замещены альтернативными линкерными группами. Эти альтернативные связывающие группы включают, помимо прочего, варианты осуществления, в которых фосфат заменен на P(O)S («тиоат»), P(S)S («дитиоат»), (O)NR₂ («амидат»), P(O)R, P(O)OR', CO или CH₂ («формацеталь»), в которых каждый R или R' независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил (1-20 C), необязательно содержащий эфирную связь (-O-), арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралкил. Не все связи в полинуклеотиде должны быть идентичными. Предыдущее описание применимо ко всем полинуклеотидам, упомянутым в данном документе, включая РНК и ДНК.

«Клетка-хозяин» включает отдельную клетку или культуру клеток, которые могут быть или были реципиентом вектора(-ов) для включения полинуклеотидных вставок. Клетки-хозяева включают потомство одной клетки-хозяина, и потомство необязательно может быть полностью идентичным (по морфологии или по комплементарности геномной ДНК) исходной родительской клетке вследствие естественной, случайной или преднамеренной мутации. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные *in vivo* полинуклеотидом(-ами) по настоящему изобретению.

Используемый в данном документе термин «носители» включает фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы, которые являются нетоксичными для клетки или млекопитающего, которое подвергается их воздействию, в применяемых дозировках и концентрациях. Часто физиологически приемлемым носителем является водный рН-буференный раствор. Примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфатный, цитратный, и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярные (менее около 10 аминокислотных остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™,

полиэтиленгликоль (PEG) и PLURONICSM.

Термин *«предупреждение»* признано в данной области техники, и когда он используется в отношении состояния, такого как болезнь глаз (например, глаукома или возрастная макулодистрофия, такая как AMD, включая географическую атрофию) или связанных симптомов, по отношению к пациенту, который не получает терапии.

Используемый в данном документе термин *«субъект»* относится к живому млекопитающему и может использоваться взаимозаменяемо с термином «пациент». Примеры млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, любой член класса млекопитающих: людей, приматов, таких как шимпанзе, и другие виды обезьян; сельскохозяйственных животных, таких как крупный рогатый скот, лошадей, овец, коз, свиней; домашних животных, таких как кролики, собаки и кошки; лабораторных животных, включая грызунов, таких как крысы, мыши и морские свинки, и тому подобное. Этот термин не обозначает конкретный возраст или пол.

Используемый в данном документе термин *«осуществление лечения»* или *«лечение»* включает уменьшение, прекращение или обращение симптомов, клинических признаков или лежащей в основе патологии состояния для стабилизации или улучшения состояния субъекта или для снижения вероятности того, что состояние субъекта ухудшится, как если бы субъект не получал лечения.

Термин *«терапевтически эффективное количество»* соединения в отношении рассматриваемого способа лечения относится к количеству соединения(ий) в препарате, которое при введении как часть требуемой схемы введения (млекопитающему, предпочтительно человеку) облегчает симптом, улучшает состояние или замедляет развитие болезненных состояний в соответствии с клинически приемлемыми стандартами для подлежащего лечению нарушения или состояния или с косметической целью, например, при разумном соотношении польза/риск, применимом к любому медицинскому лечению. Терапевтически эффективное количество в данном документе может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и вес пациента, а также способность антитела вызывать требуемый ответ у индивидуума.

Используемый в данном документе термин индивидуум, *«подверженный риску»* развития определенного заболевания, нарушения или патологического состояния, может иметь или не иметь выявляемое заболевание или симптомы заболевания, а также может проявлять или не проявлять выявляемое заболевание или симптомы заболевания до применения способов лечения, описанных в данном документе. «Подверженный риску» означает, что индивидуум имеет один или более факторов риска, которые являются измеряемыми параметрами, которые коррелируют с развитием конкретного заболевания, нарушения или патологического состояния, как известно в данной области техники. Человек, имеющий один или более из этих факторов риска, имеет более высокую вероятность развития конкретного заболевания, нарушения или патологического состояния, чем человек без одного или более из этих факторов риска.

«Хроническое» введение относится к введению лекарственного(ых) препарат(ов) в

непрерывном, а не остром режиме, чтобы поддерживать первоначальный терапевтический эффект (активность) в течение длительного периода времени. «Прерывистое» введение относится к лечению, которое не проводится последовательно без перерыва, а скорее носит циклический/периодический характер.

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, как обычно понимаемые специалистом в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Несмотря на то, что любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, могут также быть использованы в практике или тестировании данного изобретения, предпочтительные способы и материалы описаны ниже. Все публикации, упомянутые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми цитируются публикации, такие как, например, широко используемые методологии, описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); серии *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, and *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney), ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); и *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

Антитела к фактору системы комплемента C1q

Антитела к C1q, раскрытые в данном документе, являются мощными ингибиторами C1q, и их можно вводить в дозах для непрерывного ингибирования функции C1q в течение любого периода, а затем, необязательно, отменять, чтобы обеспечить восстановление нормальной функции C1q в периоды, когда его активность может быть важной. Результаты, полученные с антителами к C1q, раскрытыми в данном документе, в исследованиях на животных, могут быть легко перенесены в клинику с

гуманизированными или человеческими антителами, а также с их фрагментами и/или производными.

C1q представляет собой большой мультимерный белок массой 460 кДа, состоящий из 18 полипептидных цепей (6 А-цепей C1q, 6 В-цепей C1q и 6 С-цепей C1q). Белки системы комплемента C1r и C1s связываются с хвостовой областью C1q, образуя комплекс C1 (C1qr₂s₂).

Антитела по настоящему изобретению специфично распознают фактор системы комплемента C1q и/или C1q в комплексе C1 классического пути активации системы комплемента. Связанный фактор системы комплемента может быть получен без ограничения из любого организма, имеющего систему комплемента, включая любой организм млекопитающих, такой как человек, мышь, крыса, кролик, обезьяна, собака, кошка, корова, лошадь, верблюд, овца, коза или свинья.

Используемый в данном документе «комплекс C1» относится к белковому комплексу, который может включать без ограничения один белок C1q, два белка C1r и два белка C1s (например, C1qr²s²).

Антитела к C1q, описанные в данном документе, могут ингибировать образование комплекса C1.

Используемый в данном документе термин «фактор системы комплемента C1q» относится как к последовательностям дикого типа, так и к встречающимся в природе вариантным последовательностям.

Неограничивающим примером фактора комплемента C1q, распознаваемого антителами по настоящему изобретению, является C1q человека, содержащий три полипептидные цепи А, В и С:

C1q, А-цепь (Homo sapiens), белок, № доступа

в базе данных: NP_057075.1; № в GenBank: NM_015991:

>gi|7705753|ref|NP_057075.1|фактор комплемента C1q

предшественник подкомпонента субъединицы А [Homo sapiens]

(SEQ ID NO:1)

MEGPRGWLVLCLVLAISLASMVTEDLCRAPDGKKGEAGRPGRRRGRPGLKGEQGE
PGAPGIRTGIQGLKGDQGEPPSGNPGKVGYPGSPGLGARGIPGIKGTKGSPGNIKDQP
RPAFSAIRRNPMMGGNVVIFDVTITNQEOPYQNHSGRFVCTVPGYYYFTFQVLSQWEICL
SIVSSSRGQVRRSLGFCDTTNKGLFQVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKDPKKGHIYQGSE
ADSVFSGFLIFPSA.

C1q, В-цепь (Homo sapiens), белок, № доступа

в базе данных: NP_000482.3; № в GenBank: NM_000491.3:

>gil87298828|ref|NP_000482.3|фактор комплемента C1q

предшественник подкомпонента субъединицы В [Homo sapiens]

(SEQ ID NO:2)

MMMKIPWGSIPVLMLLLLLGLIDISQAQLSCTGPPAIPGIPGIPGTPGPDGQPGTPG
IKGEKGLPGLAGDHGEFGEKGDPIPGNPGKVGPKGPMGPKGGPGAPGAPGPKGESGD

YKATQKIAFSATRTINVPLRRDQTRFDHVITNMNNNYEPRSGKFTCKVPGLYYFTYHAS
SRGNLCVNLMRGRERAQKVVTFCDYAYNTFQVTTGGMVLEQGENVFLQATDKNSL
LGMEGANSIFSGFLLFPDMEA.

C1q, C-цепь (homo sapiens), белок, № доступа

в базе данных: NP_001107573.1; № в GenBank:

NM_001114101.1:

>gi|166235903|ref|NP_001107573.1|фактор комплемента C1q

предшественник подкомпонента субъединицы C [Homo sapiens]

(SEQ ID NO:3)

MDVGPSSLPHLGLKLLLLLLLLPLRGQANTGCYGIPGMPGLPGAPGKDG YDGLP
GPKGEPGIPAIPGIRPKGQKGEPLPGHPGKNGMPGPPGMPGVPGMPGIPGEPGEEGRY
KQKFQSVFTVTRQTHQPPAPNSLIRFNAVLTNPQGDYDTSTGKFTCKVPGLYYFVYHAS
HTANLCVLLYRSGVKVVTFCGHTSKTNQVNSGGVLLRLQVGEEVWLA VNDYYDMVGI
QGS DSVFSGFLLFPD.

Соответственно, антитело к C1q по настоящему изобретению может связываться с полипептидной А-цепью, полипептидной В-цепью и/или полипептидной С-цепью белка C1q. В некоторых вариантах осуществления антитело к C1q по настоящему изобретению связывается с полипептидной А-цепью, полипептидной В-цепью и/или полипептидной С-цепью C1q человека или его гомолога, такого как C1q мыши, крысы, кролика, обезьяны, собаки, кошки, коровы, лошади, верблюда, овцы, козы или свиньи. В некоторых вариантах осуществления антитело к C1q представляет собой человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело или его фрагмент или его производное. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как фрагмент Fab.

Все последовательности, упомянутые в следующих двадцати абзацах, включены посредством ссылки из патента США № 9708394, который включен тем самым посредством ссылки для антител и связанных композиций, которые он раскрывает.

Последовательности переменных доменов легкой цепи и тяжелой цепи антитела M1 (Mab1)

Используя стандартные методики, определяли последовательности нуклеиновых кислот и аминокислотные последовательности, кодирующие переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи антитела M1. Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи антитела M1 представляет собой:

DVQITQSPSYLAASPGETITINC**RASKSINKYLA**WYQEKPGKTNKLLIY**SGSTLQS**
GIPSRFSGSGSGTDFTLTISLPEPDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGAGTKLELK (SEQ ID
NO:4).

Гипервариабельные области (HVR) переменного домена легкой цепи выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. В некоторых вариантах осуществления HVR-L1 переменного домена легкой цепи M1 имеет последовательность RASKSINKYLA (SEQ

ID NO:5), HVR-L2 варибельного домена легкой цепи M1 имеет последовательность SGSTLQS (SEQ ID NO:6) и HVR-L3 варибельного домена легкой цепи M1 имеет последовательность QQHNEYPLT (SEQ ID NO:7).

Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи антитела M1 представляет собой:

**QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKSSGYHFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGVIH
PNSGSINYNEKFESKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAGERDSTEVLPMMDY
WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:8).**

Гиперварибельные области (HVR) варибельного домена тяжелой цепи выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. В некоторых вариантах осуществления HVR-H1 варибельного домена тяжелой цепи M1 имеет последовательность GYHFTSYWMH (SEQ ID NO:9), HVR-H2 варибельного домена тяжелой цепи M1 имеет последовательность VIH P NSGSINYNEKFES (SEQ ID NO:10) и HVR-H3 варибельного домена тяжелой цепи M1 имеет последовательность ERDSTEVLPM DY (SEQ ID NO:11).

Было определено, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая варибельный домен легкой цепи, представляет собой:

GATGTCCAGATAACCCAGTCTCCATCTTATCTTGCTGCATCTCCTGGAGAAAC
CATTA CTATTAATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAACAAATATTTAGCCTGGTATCA
AGAGAAACCTGGGAAAATAAAGCTTCTTATCTACTCTGGATCCACTTTGCAATC
TGGAATTCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACCAT
CAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTACTGTCAACAACATAATGAATA
CCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO:12).

Было определено, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая варибельный домен тяжелой цепи, представляет собой:

CAGGTCCA ACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAG
TGAAGTTGTCCTGCAAGTCTTCTGGCTACCATTTACCCAGCTACTGGATGCACTGGG
TGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTTCATCCTAATAGT
GGTAGTATTA ACTACAATGAGAAGTTCGAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAA
ATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCGGCGGT
CTATTATTGTGCAGGAGAGAGAGATTCTACGGAGGTTCTCCCTATGGACTACTGGGG
TCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:13).

Депонирование материала

Следующие материалы депонировали в соответствии с Будапештским договором в Американской коллекции типовых культур, патентный депозитарий ATCC, 10801 University Blvd., Манассас, VA 20110-2209, США (ATCC):

ID образца	Объект депонирования		ATCC
	Изотип	Дата	Номер доступа
Гибридома мыши C1qM1	IgG1,	6 июня	PTA-120399

ID образца	Изотип	Объект депонирования	АТСС
		Дата	Номер доступа
7788-1(M) 051613, продуцирующая антитело M1 к C1q	каппа	2013 г.	

Клеточную линию гибридомы, продуцирующую антитело M1 (гибридома мыши C1qM1 7788-1(M) 051613), депонировали в АТСС в условиях, обеспечивающих доступ к культуре во время рассмотрения заявки на патент и в течение 30 лет, или через 5 лет после подачи последнего запроса, или в течение срока действия патента, в зависимости от того, что дольше. Объект депонирования будет замещен, если объект депонирования станет нежизнеспособным в течение этого периода. Объект депонирования доступен в соответствии с требованиями иностранных патентных законов в странах, в которых поданы копии рассматриваемой заявки, или его потомство. Однако следует понимать, что наличие объекта депонирования не является лицензией на использование предмета изобретения в отступление от патентных прав, предоставленных правительством.

В данном документе раскрыты способы введения антитела к C1q, содержащего переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи. Антитело может связываться по меньшей мере с C1q человека, C1q мыши или C1q крысы. Антитело может представлять собой гуманизированное антитело, химерное антитело или человеческое антитело. Антитело может представлять собой моноклональное антитело, его фрагмент и/или его производное. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как фрагмент Fab. Переменный домен легкой цепи содержит HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 моноклонального антитела M1, продуцируемого линией клеток гибридомы, депонированной под номером доступа РТА-120399. Переменный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 моноклонального антитела M1, продуцируемого линией клеток гибридомы, депонированной под номером доступа в АТСС РТА-120399.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи и переменного домена тяжелой цепи содержит одно или несколько из SEQ ID NO: 5 HVR-L1, SEQ ID NO: 6 HVR-L2, SEQ ID NO: 7 HVR-L3, SEQ ID NO: 9 HVR-H1, SEQ ID NO: 10 HVR-H2 и SEQ ID NO: 11 HVR-H3.

Антитело может содержать аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи, которая на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентична SEQ ID NO: 4, предпочтительно при сохранении HVR-L1 RASKSINKYLA (SEQ ID NO: 5), HVR-L2 SGSTLQS (SEQ ID NO: 6) и HVR-L3 QQHNEYPLT (SEQ ID NO: 7). Антитело может содержать аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 85%, 90% или 95% идентична SEQ ID NO: 8, предпочтительно при сохранении HVR-H1 GYHFTSYWMH (SEQ ID NO: 9), HVR-H2

VHNPNSGSINYNEKFES (SEQ ID NO: 10) и HVR-H3 ERDSTEVLPMDY (SEQ ID NO: 11).

В данном документе раскрыты способы введения антитела к C1q, которое ингибирует взаимодействие между C1q и аутоантителом. В предпочтительных вариантах осуществления антитело к C1q вызывает клиренс C1q из кровотока или ткани.

В некоторых вариантах осуществления антитело к C1q по настоящему изобретению ингибирует взаимодействие между C1q и C1s. В некоторых вариантах осуществления антитело к C1q ингибирует взаимодействие между C1q и C1r. В некоторых вариантах осуществления антитело к C1q ингибирует взаимодействие между C1q и C1s и между C1q и C1r. В некоторых вариантах осуществления антитело к C1q ингибирует взаимодействие между C1q и другим антителом, таким как аутоантитело. В предпочтительных вариантах осуществления антитело к C1q вызывает клиренс C1q из кровотока или ткани. В некоторых вариантах осуществления антитело к C1q ингибирует соответствующие взаимодействия при стехиометрии, составляющей менее 2,5:1; 2,0:1; 1,5:1; или 1,0:1. В некоторых вариантах осуществления антитело к C1q ингибирует взаимодействие, такое как взаимодействие C1q-C1s, при приблизительно эквимоллярных концентрациях C1q и антитела к C1q. В других вариантах осуществления антитело к C1q связывается с C1q со стехиометрией, составляющей менее 20:1; менее 19,5:1; менее 19:1; менее 18,5:1; менее 18:1; менее 17,5:1; менее 17:1; менее 16,5:1; менее 16:1; менее 15,5:1; менее 15:1; менее 14,5:1; менее 14:1; менее 13,5:1; менее 13:1; менее 12,5:1; менее 12:1; менее 11,5:1; менее 11:1; менее 10,5:1; менее 10:1; менее 9,5:1; менее 9:1; менее 8,5:1; менее 8:1; менее 7,5:1; менее 7:1; менее 6,5:1; менее 6:1; менее 5,5:1; менее 5:1; менее 4,5:1; менее 4:1; менее 3,5:1; менее 3:1; менее 2,5:1; менее 2,0:1; менее 1,5:1; или менее 1,0:1. В определенных некоторых вариантах осуществления антитело к C1q связывает C1q со стехиометрией связывания, которая находится в диапазоне от 20:1 до 1,0:1 или менее 1,0:1. В определенных вариантах осуществления антитело к C1q связывает C1q со стехиометрией связывания, которая находится в диапазоне от 6:1 до 1,0:1 или менее 1,0:1. В определенных вариантах осуществления антитело к C1q связывает C1q со стехиометрией связывания, которая находится в диапазоне от 2,5:1 до 1,0:1 или менее 1,0:1. В некоторых вариантах осуществления антитело к C1q ингибирует взаимодействие между C1q и C1r, или между C1q и C1s, или между C1q и как C1r, так и C1s. В некоторых вариантах осуществления антитело к C1q ингибирует взаимодействие между C1q и C1r, между C1q и C1s и/или между C1q и как C1r, так и C1s. В некоторых вариантах осуществления антитело к C1q связывается с А-цепью C1q. В других вариантах осуществления антитело к C1q связывается с В-цепью C1q. В других вариантах осуществления антитело к C1q связывается с С-цепью C1q. В некоторых вариантах осуществления антитело к C1q связывается с А-цепью C1q, В-цепью C1q и/или С-цепью C1q. В некоторых вариантах осуществления антитело к C1q связывается с глобулярным доменом А-цепи, В-цепи и/или С-цепи C1q. В других вариантах осуществления антитело к C1q связывается с коллагеноподобным доменом А-цепи C1q, В-цепи C1q и/или С-цепи C1q.

Если антитела по настоящему изобретению ингибируют взаимодействие между двумя или более факторами системы комплемента, такое как взаимодействие между C1q и C1s или взаимодействие между C1q и C1r, взаимодействие, происходящее в присутствии антитела, может быть снижено на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% относительно контроля, где антитела по настоящему изобретению отсутствуют. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению снижают взаимодействие между двумя или более факторами системы комплемента на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%. В определенных вариантах осуществления взаимодействие, происходящее в присутствии антитела, снижается на величину, которая колеблется от по меньшей мере 30% до по меньшей мере 99% по сравнению с контролем, где антитела по настоящему изобретению отсутствуют.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению ингибируют расщепление C2 или C4 на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или на количество, которое колеблется от по меньшей мере 30% до по меньшей мере 99% по отношению к контролю, в котором антитела по настоящему изобретению отсутствуют. Способы измерения расщепления C2 или C4 хорошо известны в данной области техники. Значения EC_{50} для антител по настоящему изобретению в отношении расщепления C2 или C4 могут составлять менее 3 мкг/мл; 2,5 мкг/мл; 2,0 мкг/мл; 1,5 мкг/мл; 1,0 мкг/мл; 0,5 мкг/мл; 0,25 мкг/мл; 0,1 мкг/мл; 0,05 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению ингибируют расщепление C2 или C4 при приблизительно эквимоллярных концентрациях C1q и соответствующего антитела к C1q.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению ингибируют аутоантителозависимую и комплементзависимую цитотоксичность (CDC) на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или на количество в диапазоне от по меньшей мере 30% до по меньшей мере 99% относительно контроля, где антитела по настоящему изобретению отсутствуют. Значения EC_{50} для антител по настоящему изобретению в отношении ингибирования аутоантителозависимой и комплементзависимой цитотоксичности могут составлять менее 3 мкг/мл; 2,5 мкг/мл; 2,0 мкг/мл; 1,5 мкг/мл; 1,0 мкг/мл; 0,5 мкг/мл; 0,25 мкг/мл; 0,1 мкг/мл; 0,05 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению ингибируют комплементзависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (CDCC) на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере

мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или на количество, которое колеблется от по меньшей мере 30% до по меньшей мере 99% по отношению к контролю, в котором антитела по настоящему изобретению отсутствуют. Способы измерения CDCC хорошо известны в данной области техники. Значения EC₅₀ для антител по настоящему изобретению в отношении ингибирования CDCC могут составлять менее 3 мкг/мл; 2,5 мкг/мл; 2,0 мкг/мл; 1,5 мкг/мл; 1,0 мкг/мл; 0,5 мкг/мл; 0,25 мкг/мл; 0,1 мкг/мл; 0,05 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению ингибируют CDCC, но не антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

Гуманизированные антитела к фактору системы комплемента C1q

Гуманизированные антитела по настоящему изобретению специфично связываются с фактором системы комплемента C1q и/или белком C1q в комплексе C1 классического пути системы комплемента. Гуманизированное антитело к C1q может специфично связываться с C1q человека, C1q человека и мыши, C1q крысы или C1q человека, C1q мыши и C1q крысы.

Все последовательности, упомянутые в следующих шестнадцати абзацах, включены посредством ссылки из заявки на патент США № 14/933517, которая включена тем самым посредством ссылки для антител и связанных композиций, которые она раскрывает.

В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи человека представляет собой константную область тяжелой цепи IgG4 человека, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, или с по меньшей мере 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90% гомологией с SEQ ID NO: 47. Константная область тяжелой цепи IgG4 человека может содержать Fc-область с одной или несколькими модификациями и/или аминокислотными заменами в соответствии с нумерацией по Kabat. В таких случаях Fc-область содержит аминокислотную замену лейцина на глутамат в положении 248, где такая замена препятствует взаимодействию Fc-области с Fc-рецептором. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит аминокислотную замену серина на пролин в положении 241, где такая замена предупреждает переключение плеча в антителе.

Аминокислотная последовательность константного домена тяжелой цепи IgG4 человека (S241P L248E):
 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSV
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
 QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 47).

Антитело может содержать переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, где переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную

последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 31-34, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 90% гомологией с аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 31-34. В определенных таких вариантах осуществления вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 35-38, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 90% гомологией с аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 35-38.

Аминокислотная последовательность варианта 1 вариабельного домена тяжелой цепи (VH1):
QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSS**GYHFTSYWMH****WVKQAPGQGLEWIG****VIHPNSG**
SINYNEKFESKATITVDKSTSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAG**ERDSTEVL****PMDYWGQG**
 TSVTVSS (SEQ ID NO: 31). Гипервариабельные области (HVR) VH1 выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Аминокислотная последовательность варианта 2 вариабельного домена тяжелой цепи (VH2):
QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSS**GYHFTSYWMH****WVKQAPGQGLEWIG****VIHPNSG**
SINYNEKFESRATITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAG**ERDSTEVL****PMDYWGQG**
 TTVTVSS (SEQ ID NO: 32). Гипервариабельные области (HVR) VH2 выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Аминокислотная последовательность варианта 3 вариабельного домена тяжелой цепи (VH3):
QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSS**GYHFTSYWMH****WVKQAPGQGLEWIG****VIHPNSG**
SINYNEKFESRVTTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAG**ERDSTEVL****PMDYWGQG**
 TTVTVSS (SEQ ID NO: 33). Гипервариабельные области (HVR) VH3 выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Аминокислотная последовательность варианта 4 вариабельного домена тяжелой цепи (VH4):
QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKSS**GYHFTSYWMH****WVRQAPGQGLEWIG****VIHPNSG**
SINYNEKFESRVTTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAG**ERDSTEVL****PMDYWGQG**
 TTVTVSS (SEQ ID NO: 34). Гипервариабельные области (HVR) VH4 выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Аминокислотная последовательность варианта 1 вариабельного домена легкой каппа-цепи (Vκ1):
 DVQITQSPSYLAASLGERATINC**RASKSINKYLA**WYQQKPGKTNKLLIY**SGSTLQSG**GIPA
 RFGSGSGTDFTLTISLPEPFDAMYYC**QOHNEYPLT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 35).
 Гипервариабельные области (HVR) Vκ1 выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Аминокислотная последовательность варианта 2 вариабельного домена легкой каппа-цепи (Vκ2):
 DVQITQSPSSLSASLGERATINC**RASKSINKYLA**WYQQKPGKANKLLIY**SGSTLQSG**GIPA
 RFGSGSGTDFTLTISLPEPFDAMYYC**QOHNEYPLT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 36).

Гипервариабельные области (HVR) V_κ2 выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Аминокислотная последовательность варианта 3 вариабельного домена легкой каппа-цепи (V_κ3):
 DVQITQSPSSLSASLGERATINCR**RASKSINKYLA**WYQQKPGKAPKLLIY**SGSTLQS**GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 37).

Гипервариабельные области (HVR) V_κ3 выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Аминокислотная последовательность варианта 4 вариабельного домена легкой каппа-цепи (V_κ4):
 DIQLTQSPSSLSASLGERATINCR**RASKSINKYLA**WYQQKPGKAPKLLIY**SGSTLQS**GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAMYYC**QQHNEYPLT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 38).

Гипервариабельные области (HVR) V_κ4 выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Антитело может содержать аминокислотную последовательность вариабельного домена легкой цепи, которая на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентична SEQ ID NO: 35-38, при сохранении HVR-L1 RASKSINKYLA (SEQ ID NO: 5), HVR-L2 SGSTLQS (SEQ ID NO: 6) и HVR-L3 QQHNEYPLT (SEQ ID NO: 7). Антитело может содержать аминокислотную последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 85%, 90% или 95% идентична SEQ ID NO: 31-34, при сохранении HVR-H1 GYHFTSYWMH (SEQ ID NO: 9), HVR-H2 VIHNSGSINYNEKFES (SEQ ID NO: 10) и HVR-H3 ERDSTEVLPM DY (SEQ ID NO: 11).

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность вариабельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 35 и аминокислотную последовательность вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность вариабельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 36 и аминокислотную последовательность вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность вариабельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 37 и аминокислотную последовательность вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность вариабельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 38 и аминокислотную последовательность вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела к C1q по настоящему изобретению содержат вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит Fab-область, и константные области тяжелой цепи, которые содержат Fc-область, где область Fab специфично связывается с белком C1q по настоящему изобретению, но Fc-область не способна связывать белок C1q. В некоторых вариантах осуществления Fc-область получена из изоформа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-область не способна индуцировать активность системы комплемента и/или не способна индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит

одну или несколько модификаций, включая без ограничения аминокислотные замены. В определенных вариантах осуществления Fc-область гуманизированных антител к C1q по настоящему изобретению содержит аминокислотную замену в положении 248 в соответствии с соглашением о нумерации по Kabat, или в положении, соответствующем положению 248 в соответствии с соглашением о нумерации по Kabat, и/или в положении 241 в соответствии с соглашением о нумерации по Kabat, или в положении соответствующем положению 241 в соответствии с нумерацией по Kabat. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена в положении 248 или в положениях, соответствующих положению 248, ингибирует взаимодействие Fc-области с Fc-рецептором. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена в положении 248 или в положениях, соответствующих положению 248, представляет собой аминокислотную замену лейцина на глутамат. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена в положении 241 или в положениях, соответствующих положению 241, предупреждает переключение плеча в антителе. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена в положении 241 или в положениях, соответствующих положению 241, представляет собой аминокислотную замену серина на пролин. В определенных вариантах осуществления Fc-область гуманизированных антител к C1q по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90% или по меньшей мере около 95% гомологией с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 47.

Фрагмент Fab, связывающий C1q

До появления технологии рекомбинантной ДНК протеолитические ферменты (протеазы), расщепляющие полипептидные последовательности, использовались для анализа структуры молекул антител и определения того, какие части молекулы отвечают за их различные функции. Ограниченное переваривание протеазой папаином расщепляет молекулы антител на три фрагмента. Два фрагмента, известные как фрагменты Fab, идентичны и обладают антигенсвязывающей активностью. Фрагменты Fab соответствуют двум идентичным плечам молекулы антитела, каждое из которых состоит из полной легкой цепи, сопряженной с доменами V_H и C_{H1} тяжелой цепи. Другой фрагмент не обладает антигенсвязывающей активностью, но первоначально наблюдалось, что он легко кристаллизуется, и по этой причине он был назван Fc-фрагментом (кристаллизуемый фрагмент). Когда молекулы Fab сравнивали с молекулами IgG, было обнаружено, что Fab превосходят IgG для определенных применений *in vivo* благодаря их более высокой подвижности и способности проникать в ткани, их уменьшенному периоду полужизни в кровотоке, их способности моновалентно связывать антиген без опосредования эффекторных функции антител и их более низкой иммуногенности.

Молекула Fab представляет собой искусственный фрагмент молекулы Ig массой ~50 кДа с укороченной тяжелой цепью за счет константных доменов C_{H2} и C_{H3}.

Взаимодействие двух гетерофильных доменов (V_L - V_H и C_L - C_H1) лежит в основе двухцепочечной структуры молекулы Fab, которая дополнительно стабилизируется дисульфидным мостиком между C_L и C_H1 . Fab и IgG имеют идентичные сайты связывания антигена, образованные шестью определяющими комплементарность областями (CDR), по три из V_L и V_H (LCDR1, LCDR2, LCDR3 и HCDR1, HCDR2, HCDR3). CDR определяют гипервариабельный антигенсвязывающий сайт антител. Наибольшая изменчивость последовательности обнаружена в LCDR3 и HCDR3, которые в естественных иммунных системах создаются реаранжировкой генов V_L и J_L или V_H , D_H и J_H соответственно. LCDR3 и HCDR3 обычно образуют ядро сайта связывания антигена. Консервативные области, которые соединяют и отображают шесть CDR, называются каркасными областями. В трехмерной структуре вариабельного домена каркасные области образуют сэндвич из двух противоположных антипараллельных β -листов, которые связаны гипервариабельными петлями CDR снаружи и консервативным дисульфидным мостиком внутри. Эта уникальная комбинация стабильности и универсальности антигенсвязывающего сайта Fab и IgG лежит в основе ее успеха в клинической практике для диагностики, мониторинга, предупреждения и лечения заболеваний.

Все последовательности фрагментов Fab, связывающих C1q, включены посредством ссылки из заявки на патент США № 15/360549, которая включена тем самым посредством ссылки для антител и связанных композиций, которые она раскрывает.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение представляет фрагмент Fab антитела, связывающий C1q, который связывается с белком C1q, содержащим тяжелую (V_H/C_H1) и легкую (V_L/C_L) цепь, где фрагмент Fab антитела, связывающий C1q, имеет шесть определяющих комплементарность областей (CDR), каждой по три из V_L и V_H (HCDR1, HCDR2, HCDR3 и LCDR1, LCDR2, LCDR3). Тяжелая цепь фрагмента Fab антитела является усеченной после первого домена тяжелой цепи IgG1 (SEQ ID NO: 39) и содержит следующую аминокислотную последовательность:

QVQLVQSGAELKPKPGASVKVCSKSSGYHFTSYWMHWVKQAPGQGLEWIGVIH
PNSGSINYNEKFESRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAGERDSTEVLPMDY
 WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 T (SEQ ID NO: 39)

Определяющие комплементарность области (CDR) SEQ ID NO: 39 выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты.

Домен легкой цепи фрагмента Fab антитела содержит следующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 40):

DVQITQSPSSLSASLGERATINC**RASKSINKYLA**WYQQKPGKAPKLLI**SGSTLQ**
SGIPARFSGSGSGTDFLTISSLEPEDFAMYYC**QOHNEYPLT**FGQGTKLEIKRTVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYS
 LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 40)

Определяющие комплементарность области (CDR) SEQ ID NO: 40 выделены

полужирным шрифтом и подчеркнуты.

Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева

Антитела, подходящие для применения в способах по настоящему изобретению, могут быть получены с использованием рекомбинантных способов и композиций, например, как описано в патенте США № 4816567. В некоторых вариантах осуществления представлены выделенные нуклеиновые кислоты, имеющие нуклеотидную последовательность, кодирующую любое из антител по настоящему изобретению. Такие нуклеиновые кислоты могут кодировать аминокислотную последовательность, содержащую V_L/C_L , и/или аминокислотную последовательность, содержащую V_H/C_H1 антитела к С1q. В некоторых вариантах осуществления предложены один или более векторов (например, векторов экспрессии), содержащих такие нуклеиновые кислоты. Также может быть предложена клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. Клетка-хозяин может содержать (например, была трансдуцирована следующим): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, содержащую V_L/C_L антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую V_H/C_H1 антитела или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, содержащую V_L/C_L антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, содержащую V_H/C_H1 антитела. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин является эукариотической, например, клеткой яичника китайского хомячка (СНО) или лимфоидной клеткой (например, клеткой Y0, NS0, Sp20). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой бактерию, такую как *E. coli*.

В данном документе раскрыты способы получения антитела к С1q. Способ включает культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к С1q, в условиях, подходящих для экспрессии антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело впоследствии выделяют из клетки-хозяина (или культуральной среды клетки-хозяина).

Для рекомбинантного получения гуманизированного антитела к С1q по настоящему изобретению нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, выделяют и встраивают в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такую нуклеиновую кислоту можно легко выделить и секвенировать с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфично связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

Подходящие векторы, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любое из антител по настоящему изобретению или фрагменты их полипептидов (включая антитела), описанные в данном документе, включают без ограничения клонирующие векторы и векторы экспрессии. Подходящие векторы для клонирования могут быть сконструированы в соответствии со стандартными методиками

или могут быть выбраны из большого числа векторов клонирования, доступных в данной области техники. Хотя выбранный вектор клонирования может варьироваться в зависимости от клетки-хозяина, которую предполагается использовать, применимые векторы клонирования, как правило, обладают способностью к саморепликации, могут иметь одну мишень для конкретной рестрикционной эндонуклеазы и/или могут нести гены для маркера, который может быть использован при отборе клонов, содержащих вектор. Примеры включают плазмиды и бактериальные вирусы, например, pUC18, pUC19, Bluescript (например, pBS SK+) и его производные, mpl8, mpl9, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ДНК фага и челночные векторы, такие как pSA3 и pAT28. Эти и многие другие векторы клонирования доступны от коммерческих поставщиков, таких как BioRad, Stratagene и Invitrogen.

Векторы, содержащие представляющие интерес нуклеиновые кислоты, могут быть введены в клетку-хозяина любым из ряда подходящих способов, включая электропорацию, трансфекцию с использованием кальция хлорида, рубидий хлорида, кальций фосфата, DEAE-декстрана или других веществ; бомбардировку микрочастицами, липофекцию; и инфекцию (например, когда вектор представляет собой инфекционный агент, такой как вирус осповакцины). Выбор векторов или полинуклеотидов для введения часто зависит от характеристик клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, содержащую одну или более аминокислотных последовательностей, кодирующих антитело к С1q по настоящему изобретению.

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, включают прокариотические или эукариотические клетки. Например, антитело к С1q по настоящему изобретению может продуцироваться в бактериях, в частности, когда гликозилирование и эффекторная функция Fc не требуются. Для экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях (например, патенты США №№ 5648237, 5789199, и 5840523; и Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (В.К.С. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, в которых описана экспрессия фрагментов антител в *E. coli*). В других вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению может быть получено в эукариотических клетках, например, клетке яичника китайского хомяка (СНО) или лимфоидной клетке (например, клетке Y0, NS0, Sp20) (например, заявка на патент США № 14/269950, патент США № 8981071, *Eur J Biochem.* 1991 Jan 1;195(1):235-42). После экспрессии антитело может быть выделено из пасты бактериальных клеток в растворимой фракции и может быть дополнительно очищено.

Фармацевтические композиции и введение

Антитело к С1q (например, FabA) по настоящему изобретению можно вводить в форме фармацевтических композиций.

Терапевтические составы антитела, фрагментов антител и/или производных антител по настоящему изобретению могут быть приготовлены для хранения путем смешивания антитела, имеющего требуемую степень чистоты, с необязательными

фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]), в виде лиофилизированных составов или водных растворов. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях и включают в себя буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (PEG).

Липофекции или липосомы также могут быть использованы для доставки антитела или фрагмента антитела, или производного антитела в клетку, где предпочтительным является эпитоп или наименьший фрагмент, который специфично связывается со связывающим доменом белка-мишени.

Антитело может также быть заключено в микрокапсулы, полученные, например, методами коацервации или межфазной полимеризации, например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатиновые микрокапсулы и полиметилметакрилатные микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарств (например, липосомах, альбуминовых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и микрокапсулах) или в макроэмульсиях. Такие методики описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Составы, применяемые для введения, могут быть стерильными. Данное условие легко достижимо с помощью осуществления фильтрации через мембраны для стерильной фильтрации.

Можно изготовить препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, причем матрицы представлены в форме, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и

гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и ацетата лейпролида), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. В то время как полимеры, такие как этилен-винилацетат и молочно-гликолевая кислота, способствуют высвобождению молекул в течение более 100 дней, некоторые гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени.

Антитела, фрагменты антител и/или производные антител и композиции по настоящему изобретению обычно вводят путем интравитреального введения.

Фармацевтические композиции также могут включать, в зависимости от требуемого состава, фармацевтически приемлемые нетоксичные носители разбавителей, которые определены как носители, как правило, используемые для приготовления фармацевтических композиций для введения животным или человеку. Разбавитель выбирается таким образом, чтобы не влиять на биологическую активность комбинации. Примеры таких разбавителей включают дистиллированную воду, забуференную воду, физиологический раствор, PBS, раствор Рингера, раствор декстрозы и раствор Хэнкса. Кроме того, фармацевтическая композиция или состав могут включать другие носители, адъюванты или нетоксичные, нетерапевтические, неиммуногенные стабилизаторы, вспомогательные вещества и т.п. Композиции также могут содержать вспомогательные вещества, необходимые для приближения их к физиологическим условиям, такие как регулирующие pH средства и буферные средства, регулирующие токсичность средства, смачивающие средства и детергенты.

Композиция также может содержать любой из множества стабилизирующих средств, таких как, например, антиоксидант. Когда фармацевтическая композиция содержит полипептид, то полипептид может образовывать комплекс с различными хорошо известными соединениями, которые повышают стабильность полипептида *in vivo* или иным образом усиливают его фармакологические свойства (например, увеличивают время полужизни полипептида, снижают его токсичность, усиливают другие фармакокинетические и/или фармакодинамические характеристики, повышают растворимость или поглощение). Примеры таких модификаций или комплексообразующих средств включают сульфат, глюконат, цитрат и фосфат. Полипептиды композиции также могут образовывать комплексы с молекулами, которые усиливают их свойства *in vivo*. Такие молекулы включают, например, углеводы, полиамины, аминокислоты, другие пептиды, ионы (например, натрий, калий, кальций, магний, марганец) и липиды. Дополнительное руководство касательно составов, которые являются подходящими для различных типов введения, можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed. (1985). Краткий обзор способов доставки лекарственных средств см. Langer, Science 249:1527-1533 (1990).

Токсичность и терапевтическую эффективность активного ингредиента можно определить в соответствии со стандартными фармацевтическими процедурами на

культурах клеток и/или экспериментальных животных, включая, например, определение LD50 (доза, летальная для 50% популяции) и ED50 (доза, терапевтически эффективная у 50% популяции). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами является терапевтическим индексом и может быть выражено в виде отношения LD50/ED50. Соединения, которые демонстрируют большие терапевтические индексы, являются предпочтительными.

Данные, полученные на основе клеточных культур и/или исследований на животных, и/или клинических испытаний на людях, могут быть использованы при составлении диапазона доз для человека. Доза активного ингредиента обычно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, который включает ED50 с низкой токсичностью. Доза может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения.

Компоненты, используемые для составления фармацевтических композиций, предпочтительно имеют высокую чистоту и по сути не содержат потенциально вредных примесей (например, по меньшей мере пищевую степень чистоты (NF - National Food grade), как правило, по меньшей мере аналитическую степень чистоты и более конкретно по меньшей мере фармацевтическую степень чистоты). Более того, композиции, предназначенные для парентерального применения, как правило, стерильны. В той степени, в которой данное соединение необходимо синтезировать перед использованием, полученный продукт, как правило, практически не содержит каких-либо потенциально токсичных агентов, в частности любых эндотоксинов, которые могут присутствовать в процессе синтеза или очистки. Композиции для исходного введения также, как правило, по сути изотоничны и изготавливаются в условиях, соответствующих GMP.

Композиции по настоящему изобретению можно вводить с помощью любой приемлемой с медицинской точки зрения процедуры, например, интравитреальной инъекции.

Способы лечения

Настоящее изобретение в целом относится к композициям и способам предупреждения, снижения риска развития или лечения болезни глаз (например, глаукомы или возрастной макулодистрофии, такой как AMD, включая географическую атрофию) у пациента-человека. Такие способы включают введение пациенту композиции, содержащей от около 1 мг до около 10 мг (например, около 1 мг, около 1,5 мг, около 2 мг, около 2,5 мг, около 3 мг, около 3,5 мг, около 4 мг, около 4,5 мг, около 5 мг, около 5,5 мг, около 6 мг, около 6,5 мг, около 7 мг, около 7,5 мг, около 8 мг, около 8,5 мг, около 9 мг, около 9,5 мг или около 10 мг антитела к C1q) антитела к C1q посредством интравитреальной инъекции. Такие способы также включают введение пациенту композиции, содержащей от около 1 мг до около 10 мг (например, около 1 мг, около 1,5 мг, около 2 мг, около 2,5 мг, около 3 мг, около 3,5 мг, около 4 мг, около 4,5 мг, около 5 мг, около 5,5 мг, около 6 мг, около 6,5 мг, около 7 мг, около 7,5 мг, около 8 мг, около 8,5 мг, около 9 мг, около 9,5 мг или около 10 мг антитела к C1q) антитела к C1q посредством

интравитреальной инъекции, при этом указанное антитело содержит переменный домен легкой цепи, содержащий HVR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HVR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 и HVR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и переменный домен тяжелой цепи, содержащий HVR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, HVR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и HVR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: НЕТ: 11. Вводимая композиция может содержать от около 1 мг до около 5 мг антитела к C1q. Вводимая композиция может содержать от около 1 мг до около 2,5 мг, от около 2,5 мг до около 5 мг, от около 5 мг до около 7,5 мг или от около 7,5 мг до около 10 мг антитела к C1q. Вводимая композиция может содержать около 5 мг антитела к C1q. Вводимая композиция может содержать около 10 мг антитела к C1q. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 95% гомологию с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 4 и 35-38, и где переменный домен легкой цепи содержит HVR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HVR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и HVR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4 и 35-38. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 95% гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 8 и 31-34, и где переменный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, HVR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и HVR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8 и 31-34. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, с по меньшей мере около 95% гомологией с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 4 и 35-38, и где переменный домен легкой цепи содержит HVR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HVR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и HVR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, с по меньшей мере около 95% гомологией с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 8 и 31-34, и где переменный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, HVR-H2, имеющую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 10, и HVR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4 и 35-38, и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8 и 31-34. В некоторых вариантах осуществления антитело может представлять собой моноклональное антитело, гуманизированное антитело, человеческое антитело, химерное антитело, фрагмент антитела или производное антитела. Фрагмент антитела может представлять собой фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент F_v, диатело или молекулу одноцепочечного антитела. В некоторых вариантах осуществления фрагмент Fab содержит фрагмент Fab тяжелой цепи SEQ ID NO: 39 и фрагмент Fab легкой цепи SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления антитело вводят один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в месяц, один раз в 4 недели, один раз в шести недель, один раз в 8 недель, один раз в два месяца, один раз в 10 недель, один раз в 12 недель, один раз в три месяца или один раз в 4 месяца. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят в течение по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев или по меньшей мере 12 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления болезнь глаз представляет собой глаукому или возрастную макулодистрофию, такую как географическая атрофия.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления FabA вводят в дозе 2,5 мг/глаз один раз в месяц, один раз в 4 недели, один раз в 6 недель или один раз в два месяца в виде IVT инъекции.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления FabA вводят в дозе 5 мг/глаз один раз в месяц, один раз в 4 недели, один раз в 6 недель или один раз в два месяца в виде IVT инъекции.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления FabA вводят в дозе 5 мг/глаз один раз в месяц, один раз в 4 недели, один раз в 6 недель или один раз в два месяца в виде IVT инъекции.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления FabA вводят в дозе 10 мг/глаз один раз в месяц, один раз в 4 недели, один раз в 6 недель или один раз в два месяца в виде IVT инъекции.

Инъекция FabA выполняется врачом, имеющим квалификацию и опыт для выполнения IVT инъекций с использованием асептической техники.

Антитело к C1q может ингибировать взаимодействие между C1q и аутоантителом, или между C1q и C1r, или между C1q и C1s, или может способствовать клиренсу C1q из кровотока или ткани. В некоторых вариантах осуществления антитело к C1q имеет константу диссоциации (K_D), которая находится в диапазоне от 100 нМ до 0,005 нМ или менее 0,005 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитело к C1q связывает C1q со

стехиометрией связывания, которая находится в диапазоне от 20:1 до 1,0:1 или менее 1,0:1, стехиометрией связывания, которая находится в диапазоне от 6:1 до 1,0:1 или менее 1,0:1, или стехиометрией связывания, которая находится в диапазоне от 2,5:1 до 1,0:1 или менее 1,0:1.

Способы ингибируют биологическую активность C1q. Например, (1) связывание C1q с аутоантителом, (2) связывание C1q с C1r, (3) связывание C1q с C1s, (4) связывание C1q с фосфатидилсеринном, (5) связывание C1q с пентраксином-3, (6) связывание C1q связывание с С-реактивным белком (CRP), (7) связывание C1q с глобулярным рецептором C1q (gC1qR), (8) связывание C1q с рецептором системы комплемента 1 (CR1), (9) связывание C1q с В-амилоидом или (10) Связывание C1q с кальретикулином. В других вариантах осуществления биологическая активность C1q представляет собой (1) активацию классического пути активации системы комплемента, (2) снижение лизиса и/или снижение отложения C3, (3) активацию антител и комплементзависимую цитотоксичность, (4) гемолиз CH50, (5) снижение лизиса эритроцитов, (6) снижение фагоцитоза эритроцитов, (7) снижение инфильтрации дендритных клеток, (8) ингибирование опосредованного комплементом лизиса эритроцитов, (9) уменьшение лимфоцитарной инфильтрации, (10) уменьшение макрофагальной инфильтрации, (11) уменьшение отложения антител, (12) уменьшение нейтрофильной инфильтрации, (13) снижение фагоцитоза тромбоцитов, (14) снижение лизиса тромбоцитов, (15) улучшение выживаемости трансплантата, (16) снижение опосредованного макрофагами фагоцитоза, (17) снижение опосредованной аутоантителами активации системы комплемента, (18) снижение разрушения эритроцитов вследствие трансфузионных реакций, (19) снижение лизиса эритроцитов вследствие аллоантител, (20) уменьшение гемолиза вследствие трансфузионных реакций, (21) уменьшение опосредованного аллоантителами лизиса тромбоцитов, (22) нормализацию анемии, (23) нормализацию эозинофилии, (24) снижение отложения C3 на эритроцитах (например, снижение отложения C3b, iC3b и т.д. на эритроцитах), (25) снижение отложения C3 на тромбоцитах (например, снижение отложения C3b, iC3b и т.д., на тромбоцитах), (26) снижение продуцирования анафилатоксинов, (27) снижение образования пузырей, опосредованного аутоантителами, (28) снижение индуцированной аутоантителами эритематозной болезни, (29) снижение разрушения эритроцитов вследствие трансфузионных реакций, (30) снижение лизиса тромбоцитов вследствие трансфузионных реакций, (31) снижение активации тучных клеток, (32) снижение высвобождения гистамина тучными клетками, (33) снижение сосудистой проницаемости, (34) снижение отложения комплемента на эндотелии трансплантата, (35) продуцирование антител В-клетками, (36) созревание дендритных клеток, (37) пролиферацию Т-клеток, (38) продуцирование цитокинов, (39) активацию микроглии, (40) реакцию Arthus, (41) снижение образования анафилатоксина в эндотелии трансплантата или (42) активацию клеток, экспрессирующих рецептор комплемента 3 (CR3/C3).

В некоторых вариантах осуществления гемолиз CH50 включает гемолиз CH50

человека. Антитело может быть способно нейтрализовать от по меньшей мере около 50% до около 100% гемолиза СН50 человека. Антитело может быть способно нейтрализовать около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90%, около 100% гемолиза СН50 человека. Антитело может быть способно нейтрализовать по меньшей мере 50% гемолиза СН50 в дозе, составляющей менее 150 нг/мл, менее 100 нг/мл, менее 50 нг/мл или менее 20 нг/мл.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, рекомбинантное антитело, гуманизированное антитело, человеческое антитело, химерное антитело, моновалентное антитело, полиспецифическое антитело или фрагмент антитела или производное антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как фрагмент Fab. Примерами фрагмента антитела являются фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fv, диатело и молекула одноцепочечного антитела.

Предполагается, что композиции могут быть получены и использованы под руководством врача для применения *in vivo*. Дозировка терапевтического состава может широко варьироваться в зависимости от характера заболевания, частоты введения, способа введения, клиренса средства из организма хозяина и т.п.

Используемые в данном документе термины «хронически вводимое», «хроническое лечение», «осуществление лечения хронически» или аналогичные их грамматические вариации относятся к схеме лечения, которая используется для поддержания определенной пороговой концентрации терапевтического средства в глазу пациента для того, чтобы полного или существенного подавления системной активности системы комплемента у пациента в течение длительного периода времени. Соответственно, пациент, постоянно получающий антитело к C1q, может получать лечение в течение периода времени, которое превышает или равно 2 недели (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 или 52 недели; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев; или 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5 или 12 лет или в течение оставшейся части жизни пациента) антителом в количестве и с частотой введения, которые достаточны для поддержания концентрации антитела в глазу пациента, которая ингибирует или по сути ингибирует системную активность системы комплемента у пациента. В некоторых вариантах осуществления антитело можно постоянно вводить пациенту, нуждающемуся в этом, в количестве и с частотой, которые эффективны для поддержания гемолитической активности сыворотки крови на уровне менее или равном 20% (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или даже ниже 5%). В некоторых вариантах осуществления антитело можно вводить пациенту в количестве и с такой частотой, которые эффективны для поддержания уровней лактатдегидрогеназы (LDH) в сыворотке крови на уровне по меньшей мере 20%

(например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или даже ниже 5%) нормального диапазона для LDH.

Терапевтические средства, например, антитела к C1q, могут быть включены в различные составы для терапевтического введения в комбинации с соответствующими фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Оценка FabA в доклинических исследованиях

Лекарственный препарат FabA представляет собой стерильную изотоническую жидкость для IVT инъекции.

FabA поставляется в виде стерильных одноразовых флаконов для IVT инъекции.

С FabA проводили значительное количество фармакологических исследований *in vitro* и *in vivo*.

Антитела Mab1, Mab1-Fab и Mab2 были активны в модели острой глаукомы у мышей, защищая от потери ганглиозных клеток сетчатки и/или нервных волокон. В модели фотоокислительного повреждения, индуцированного светом у мышей, Mab1, введенное интравитреально, защищало от потери фоторецепторных клеток и функциональной связности сетчатки в глазу.

Исследования FabA, проведенные на основе GLP, состоят из токсикологического исследования для глаз крысы при однократном введении и трех токсикологических исследований глаза яванского макака при повторном введении. Путь введения для токсикологических исследований представляет собой IVT инъекцию. В исследованиях, проведенных на основе GLP, с IVT однократной и двукратной дозой (один раз в месяц) FabA не продемонстрировал признаков неблагоприятной глазной токсичности с уровнем отсутствия наблюдаемого неблагоприятного воздействия (NOAEL), составляющим 5 мг/глаз (эквивалентно дозе 10 мг для человека) один раз в месяц у яванских макаков и 0,05 мг/глаз (эквивалентно дозе 10 мг для человека) в исследовании однократной дозы на крысах. В 26-недельном хроническом токсикологическом исследовании для глаз у яванских макаков неблагоприятные изменения глаз были ассоциированы с процедурой двойной инъекции и/или были определены как опосредованные антителами к лекарственным препаратам (ADA), а не как прямой эффект IVT введения FabA.

Проводили фармакокинетические оценки FabA в сыворотке крови и стекловидном теле крыс и яванских макаков. Уровни C1q измеряли в стекловидном теле в качестве маркера PD для ингибирования C1q с помощью FabA у обезьян. PK/PD и TK/PD исследования на обезьянах продемонстрировали выраженный PD эффект в отношении глаз, соответствующий уровню воздействия лекарственного средства на основе FabA на стекловидное тело.

Связывание и аффинность молекул FabA и предшественников C1q человека

Аффинность связывания C1q молекулами FabA и предшественников также исследовали с помощью ELISA. Все молекулы (Mab2-Fab, FabA и Mab2, Mab1 и Mab1-Fab) проявляли аффинность к C1q человека с полумаксимальной эффективной

концентрацией (EC50) в диапазоне 2,2-4,9 нг/мл (20-95 пМ). EC50 для связывания FabA с C1q составляет 2,5 нг/мл.

Влияние на IgM-опосредованный гемолиз эритроцитов

Измеряли активность FabA, Mab2 и Mab2-Fab в отношении функционального ингибирования классического комплементзависимого гемолиза IgM-опсонизированных эритроцитов в сыворотке крови человека (фигура 3). Три молекулы обладают почти одинаковой эффективностью, что согласуется с их эквивалентной аффинностью связывания. Полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC50) FabA, ингибирующая гемолиз покрытых IgM RBC, составляет 0,62 мкг/мл (~12 нМ).

Фармакологические исследования in vivo

Обработка антителами к C1q предупреждает повреждение зрительного нерва в модели острой глаукомы на мышах.

У мышей введение гранул полистирола в переднюю камеру глаза приводит к резкому повышению IOP, потере ганглиозных клеток сетчатки и повреждению зрительного нерва в течение 2 недель. Mab1, Mab1-Fab и Mab2 вводили мышам интравитреально за день до и через 7 дней после повышения IOP. В каждой временной точке вводили 2 мкл 10 мг/мл антитела или физиологического раствора. Исходя из объема стекловидного тела глаза мыши 5-10 мкл, концентрация антитела составляла 2000-4000 мкг/мл. Через 2 недели после повреждения собирали зрительные нервы и количественно определяли количество интактных и поврежденных аксонов. Обработка антителом к C1q приводила к защите от потери RGC и/или повреждения нервных волокон сетчатки в этой модели индуцированной глаукомы на мышах (фигура 4).

Обработка антителами к C1q защищает от повреждения фоторецепторных клеток в модели фотоокислительного повреждения, вызванного светом.

Фотоокислительное повреждение приводило к потере фоторецепторов сетчатки, когда мыши подвергались воздействию 100 клк естественного белого LED в течение 1-7 дней. В этой модели наблюдали зависящее от времени увеличение экспрессии гена C1qa в течение 3-7 дней, что коррелировало с гибелью фоторецепторных клеток и рекрутингом микроглии/макрофагов. У мышей C1qa^{-/-} наблюдалась меньшая гибель фоторецепторных клеток, сниженный рекрутинг микроглии/макрофагов к повреждению фоторецептора и более высокая зрительная функция через 14 дней после индукции фотоповреждения, но не через 7 дней. IVT введение антитела Mab1 в день 7 после фотоповреждения уменьшало потерю фоторецепторных клеток и поддерживало функцию сетчатки, что измерялось с помощью электроретинограммы (фигура 5). Мышам вводили 1 мкл 7,5 мг/мл антитела, что эквивалентно концентрации 750-1500 мкг/мл в стекловидном теле. В отличие от этого, системная доставка Mab1 в дозе 100 мг/кг в дни 0, 4 и 8 не влияла на потерю или функцию фоторецепторов. Ретинальный C1q в основном экспрессировался субретинальной микроглией/макрофагами, расположенными во внешней части сетчатки на ранних стадиях AMD и в сетчатке мышей. Таким образом, защита с помощью антитела к C1q предполагает четкую роль C1q в инициации повреждения фоторецепторов и

классического каскада системы комплемента в патогенезе ГА при заболеваниях человека.

Фармакологическая безопасность

Системное воздействие после хронического IVT введения дозы у 26-недельных яванских макак не превышало 86,3 нг/мл, в то время как системное воздействие Mab2 с той же CDR при IV введении один раз в неделю в 26-недельном исследовании яванских макак превышало 1 мг/мл при NOAEL, составляющем 200 мг/кг.

Таким образом, конечные точки фармакологической безопасности полноразмерного антитела Mab2 после IV введения до 200 мг/кг еженедельно в 4-недельном исследовании токсичности, проведенном на основе GLP, с повторными дозами на обезьянах и до 200 мг/кг еженедельно в 26-недельном исследовании токсичности, проведенном на основе GLP, с повторными дозами на обезьянах, в котором не было доказательств связанного с лечением воздействия на сердечно-сосудистые, респираторные или неврологические конечные точки, подтверждает системную безопасность IVT введения FabA.

Кроме того, конечные точки фармакологической безопасности для FabA после SC введения до 20 мг/кг в день в 4-недельном исследовании токсичности, проведенном на основе GLP, с повторными дозами на обезьянах, где отсутствовали доказательства связанного с лечением воздействия на сердечно-сосудистую, респираторную или неврологическую конечные точки подтверждают системную безопасность IVT вводимого FabA.

Фармакокинетика у животных

Доклинические исследования, предназначенные для характеристики PK, TK, and PD FabA, проводились на крысах и яванских макаках. Эти исследования включают PK исследования при IVT введении с однократной дозой на крысах и яванских макаках, а также исследования TK/PD с повторными дозами на яванских макаках с FabA. Более обширные исследования TK/PD проводили на обезьянах, и не было выявлено токсичности для глаз ни в исследованиях однократной дозы на крысах, ни на обезьянах.

Фармакокинетические/токсикокинетические/фармакодинамические анализы

Фармакокинетика FabA в стекловидном теле

После однократного двустороннего IVT введения FabA крысам в дозе 0,01 мг/глаз (эквивалентно дозе 2 мг для человека) или 0,05 мг/глаз (эквивалентно дозе 10 мг для человека) лекарственное средство выводилось из стекловидного тела относительно быстро, в соответствии с периодом полужизни около 12 часов при обоих уровнях дозы. У яванских макаков, также получавших двустороннее IVT введение FabA, лекарственное средство распределялось из стекловидного тела медленнее по сравнению с крысами с периодом полужизни примерно 3 дня как для группы с дозой 1 мг/глаз (эквивалентно дозе 2 мг для человека), так и для группы с дозой 5 мг/глаз (эквивалентно дозе 10 мг для человека).

У обоих видов PK FabA при IVT введении была дозолинейной. Данные токсикологических исследований для глаз на яванских макаках, которым FabA вводили

дважды в течение 28-дневного периода в дозах 1,0 мг/глаз (эквивалентно дозе 2 мг для человека), 2,5 мг/глаз (эквивалентно дозе 5 мг для человека) или 5,0 мг/глаз (эквивалентно дозе 10 мг для человека), указывают на то, что концентрации в стекловидном теле во время умерщвления (т.е. через 15 и 30 дней после второй дозы) в целом соответствовали данным, полученным при однократном IVT введении дозы.

В 26-недельном хроническом токсикологическом исследовании глаз у яванских макак, где FabA вводили IVT 2,5 мг/глаз ежемесячно (эквивалентно дозе 5 мг для человека), 5 мг/глаз ежемесячно (эквивалентно дозе 10 мг для человека) или 5 мг/глаз раз в две недели (обе дозы 5 мг/глаз впоследствии снижали до 2,5 мг/глаз и их обозначают как 5/2,5 мг/глаз), концентрации FabA в стекловидном теле поддавались количественному определению в день 184 у всех животных, получавших FabA до дня 169, и ниже предела количественного определения (BQL) у всех животных в день 242/243 после 10-недельного периода восстановления без введения дозы. Концентрации FabA в стекловидном теле демонстрировали высокую вариабельность без четких различий или тенденций между группами дозы или полом.

Фармакокинетика FabA в сыворотке крови

После однократного IVT введения концентрации в сыворотке крови были намного ниже, чем в стекловидном теле, при этом отношение C_{\max} в сыворотке крови/ C_{\max} в стекловидном теле составляло ~0,003 у крыс и 0,000001 у яванских макак. У яванских макак, получавших двустороннее IVT введение FabA дважды в течение 28-дневного периода, концентрации в сыворотке крови были низкими, а наиболее высокая средняя пиковая концентрация (C_{\max}) составляла 10,1 нг/мл, что наблюдалось после IVT введения второй дозы 5 мг/глаз (эквивалентно дозе 10 мг для человека). Поскольку FabA распределяется из стекловидного тела в компартмент сыворотки крови, FabA может либо связываться с Clq, либо оставаться в своей свободной форме и поддаваться количественному определению с помощью анализа, что приводит к низким концентрациям FabA в сыворотке крови, которые не поддаются количественному определению (т.е. <1,25 нг/мл) в группе 1 мг/глаз и среднему значению C_{\max} 3,3 и 10,1 нг/мл для 2,5 и 5,0 мг/глаз соответственно.

В отличие от этого, после IV введения FabA в дозе 10 мг/кг максимальные концентрации FabA составляли 13800 и 17000 нг/мл у 2 протестированных яванских макак, после чего концентрации очень быстро снижались, что соответствует периоду полужизни примерно 2 часа, как и ожидалось для фрагмента Fab.

При сравнении концентраций FabA в сыворотке крови после двустороннего IVT введения (5 мг/глаз) дважды в течение 28-дневного периода с концентрациями, полученными после системного IV введения Mab2 в дозе 200 мг/кг один раз в неделю в течение 4 недель, воздействие FabA в сыворотке крови были значительно ниже (отношение C_{\max} FabA/Mab2 0,00000701).

В 26-недельном хроническом токсикологическом исследовании глаз у яванских макак, где FabA вводили IVT 2,5 мг/глаз ежемесячно, 5/2,5 мг/глаз ежемесячно или 5/2,5

мг/глаз раз в две недели, системное воздействие FabA в сыворотке крови было низким, что соответствует местному пути введения. Концентрации FabA в сыворотке крови в день 85 не превышали 86,3 нг/мл, а в день 169 после введения последней дозы концентрации FabA в сыворотке крови не превышали 60,8 нг/мл. Максимальные концентрации FabA в сыворотке крови наблюдались через 24-48 часов после введения дозы в зависимости от уровней доз/схем и дней оценки. Значения периода полужизни ($T_{1/2}$) для FabA в сыворотке крови поддавались расчету/сообщению только в нескольких случаях у животных в группе 5/2,5 мг/глаз один раз в две недели и варьировались от 49,9 до 143 часов во все дни оценки, вероятно, отражая распределение из глазного пространства в сыворотку крови. Имело место незначительно накопление FabA в сыворотке крови при повторных ежемесячных IVT дозах в дозе 2,5 мг/глаз. Однако в этой группе в каждый последующий день оценки после дня 1 концентрации FabA в сыворотке крови становились все более поддающимися расчету. Накопление не могло быть определено с дня 1 в любых других группах вследствие изменений уровней доз после дня 57. Соотношение площади под кривой ко времени «t» ($AUC[0-t]$) в день 169/день 85 варьировало от 0,0407 до 0,664 в дозе 5/2,5 мг/глаз один раз в месяц у самцов и самок и от 0,132 до 7,15 в дозе 5/2,5 мг/глаз один раз в две недели у самцов и самок. При сравнении среднего комбинированного системного воздействия FabA и Mab2 в зависимости от пола после хронического 26-недельного введения яванским макакам воздействие FabA AUC_{0-t} (1230 ч*нг/мл или 1,23 ч*мкг/мл) после двустороннего IVT введения в дозе 5/2,5 мг/глаза один раз в две недели по сравнению с AUC_{0-t} в дозе 200 мг/кг (3150000 ч*мкг/мл), полученной после системного IV введения Mab2 один раз в неделю, воздействие FabA в сыворотке крови было значимо ниже (отношение C_{max} FabA/Mab2 0,000000073, отношение AUC_{0-t} 0,00000039).

Фармакодинамика глазного C1q

У контрольных животных средняя концентрация свободного C1q в стекловидном теле составляла 40,3 нг/мл, в то время как в стекловидном теле яванских макаков, получавших однократную дозу FabA IVT, равную 1 мг/глаз (эквивалентно 2 мг дозы для человека) или 5 мг/глаз (эквивалентно 10 мг человека), уровни свободного C1q были ниже предела обнаружения (<1,953 нг/мл) в течение всего периода исследования (30 дней), что указывает на полное подавление C1q. У обезьян, которые получали FabA каждые 28 дней, всего 2 дозы, C1q оставался подавленным в течение 15 дней после введения второй дозы при всех 3 уровнях доз (т.е. 1, 2,5 и 5 мг/глаз каждые 28 дней x 2 дозы). Через тридцать дней после введения второй дозы FabA C1q оставался ниже предела обнаружения в некоторых, но не во всех глазах.

Через пятнадцать дней после введения второго IVT дозы 5 мг/глаз >80% C1q связывалось с FabA в сетчатке, сосудистой оболочке и диске зрительного нерва. Через тридцать дней после второго введения 5 мг/глаз C1q оставался подавленным только в сетчатке и сосудистой оболочке глаза.

В 26-недельном хроническом токсикологическом исследовании глаз у яванских

макаков, где FabA вводили IVT в дозе 2,5 мг/глаз ежемесячно, 5/2,5 мг/глаз ежемесячно или 5/2,5 мг/глаз один раз в две недели, при терминальной аутопсии наблюдалось снижение уровней C1q стекловидного тела во всех группах, получавших FabA; и при терминальной и восстановительной аутопсии, у животных с перерывом введения дозы и/или после 10-недельного периода восстановления без введения дозы соответственно уровни C1q в стекловидном теле восстановились и были сопоставимы с контрольной группой.

C1q в сыворотке крови и ингибирование гемолиза в сыворотке крови

После двустороннего IVT введения 5 мг/глаз (эквивалентно дозе 10 мг для человека) яванским макакам C1q-зависимый гемолиз в сыворотке крови ингибировался на ~50-80%, что продолжалось примерно 24-48 часов после введения первой IVT дозы и до 96 часов после введения второй дозы FabA с последующим возвращением к исходному уровню.

После однократного IV введения 10 мг/кг яванским макакам максимальное ингибирование C1q-зависимого гемолиза в сыворотке крови достигалось через 1 час. Максимальное ингибирование сохранялось в течение ~24 часов и возвращалось к исходному уровню через 120 часов после введения FabA. Свободный C1q сыворотки крови также быстро снижался, но не возвращался к исходному значению через 120 часов, что позволяет предположить, что некоторые FabA оставались связанными с циркулирующим C1q в течение этого периода времени.

Токсикологическое исследование

Безопасность FabA поддерживается комплексной программой доклинической офтальмологической токсикологии, разработанной для поддержки применения FabA для IVT введения в клинических испытаниях. Первоначальные исследования однократной дозы проводили на крысах и яванских макаках с FabA, и ни у одного из этих видов токсичности для глаз не наблюдалось. На основании аналогичных результатов у крыс и обезьян, а также данных фармакологии *in vitro* и данных гомологии последовательностей, которые показали, что обезьяна была более подходящей, чем крыса, яванского макака выбирали для токсикологических исследований для глаз повторных доз FabA.

Токсикологические исследования для глаз повторных доз включали офтальмологические исследования (OE), IOP, электроретинограмму (ERG), глазную гистопатологию и измерение FabA в сыворотке крови и стекловидном теле для ТК анализа. Кроме того, PD свойства FabA характеризовались измерением C1q в стекловидном теле (во всех исследованиях с повторными дозами) и тканях глаза (в исследованиях с двумя дозами), а также ингибированием C1q-зависимого гемолиза в сыворотке крови (в исследованиях с двумя дозами).

Токсичность однократной дозы

IVT введение FabA хорошо переносилось в токсикологических исследованиях для глаз с однократной дозой (крысы и яванские макаки). В этих исследованиях NOAEL для крыс и яванских макаков считались равными 0,05 мг/глаз (эквивалентно дозе 10 мг для

человека) и 5 мг/глаз (эквивалентно дозе 10 мг для человека) соответственно, которые были наиболее высокими дозами, оцененными в каждом исследовании, и эквивалентны (2,5 мг/мл) с поправкой на объем стекловидного тела (крыса 0,02 мл, обезьяна 2 мл).

Исследование токсичности для глаз однократной дозы FabA путем интравитреальной инъекции на крысах Sprague Dawley, проведенное на основе GLP

В данном токсикологическом исследовании для глаз однократной дозы на крысах, проведенном на основе GLP, несущую среду или FabA вводили в дозах 0,01 мг/глаз (эквивалентно дозе 2 мг для человека) и 0,05 мг/глаз (эквивалентно дозе 10 мг для человека) путем IVT инъекции однократно билатерально молодым взрослым самцам крыс. Животных, получавших FabA, умерщвляли в день 1 (через 6 часов после введения дозы), день 3, день 7, день 10, день 20, день 30, а всех контрольных животных, получавших несущую среду, умерщвляли в день 30. Все животные доживали до запланированного вскрытия.

В это исследование включали оценку стандартных параметров безопасности. Образцы крови собирали при умерщвлении, и терминальные образцы стекловидного получали для ТК анализа. Кроме того, оценивали офтальмологические исследования (ОЕ), включая ИОР и гистопатологию глаз.

Никаких изменений, связанных с FabA, не отмечали ни в одном оцениваемом параметре безопасности, включая ОЕ, ИОР и гистопатологию глаз.

Воздействие FabA на стекловидное тело подтверждали с помощью ТК у обработанных животных в течение от 6 часов (первый сбор) до 144 часов после введения как 0,01 мг/глаз (эквивалентно дозе 2 мг для человека), так и 0,05 мг/глаз (эквивалентно дозе 10 мг для человека). Воздействие FabA на сыворотку крови подтверждали при ТК у обработанных животных (только через 2-48 часов после введения дозы) в дозах 0,01 и 0,05 мг/глаз.

В этом исследовании не наблюдали побочных эффектов, которые считались связанными с FabA, при любом уровне дозы, включая 0,05 мг/глаз, наиболее высокую оцениваемую дозу. На основании этих результатов NOAEL составил 0,05 мг/глаз (2,5 мг/мл в стекловидном теле).

Исследование токсичности для глаз однократной дозы FabA путем интравитреальной инъекции на яванских макаках, проведенное не на основе GLP

В данном токсикологическом исследовании для глаз яванских макаков, проведенном не на основе GLP, несущую среду или FabA вводили двусторонне путем IVT инъекции в дозах 1 мг/глаз (эквивалентно дозе 2 мг для человека) и 5 мг/глаз (эквивалентно дозе 10 мг для человека) молодым взрослым самкам яванских макаков. Животных, получавших FabA, умерщвляли в день 1 (через 6 часов после введения дозы), день 3, день 7, день 10, день 20, день 30. Всех контрольных животных с несущей средой умерщвляли в день 30, и все животные выжили до запланированного вскрытия.

В этом исследовании оценивали стандартные параметры безопасности, включая ОЕ, ИОР и гистопатологию глаз. Кроме того, на протяжении всего исследования собирали

образцы крови и анализировали терминальные образцы стекловидного тела в отношении ТК и PD.

Изменения, связанные с FabA, ограничивались неблагоприятными явлениями, не ассоциированными с воспалением. Эти результаты включали гистиоцитарные инфильтраты в сосудистой оболочке глаза и легкую базофилию в группе с дозой 1 мг/глаз. Результаты при дозе 5 мг/глаз включали гистиоцитарные инфильтраты в сосудистой оболочке глаза и базофилию от минимальной до легкой степени.

Никаких изменений, связанных с FabA, в OE и IOP не наблюдали. В этом исследовании не наблюдали побочных эффектов, которые считались связанными с FabA, при любом уровне дозы, включая 5 мг/глаз (наиболее высокая оцениваемая доза). На основании этих результатов считается, что NOAEL составляет 5 мг/глаз (2,5 мг/мл в стекловидном теле).

Воздействие FabA на стекловидное тело подтверждали при ТК у всех обработанных животных в течение всего периода исследования (до дня 30). Воздействие FabA на сыворотку крови отсутствовало при дозе 1 мг/глаз, было низким и временным при дозе 5 мг/глаз и не превышало 6 нг/мл (LLOQ 1,25 нг/мл). C1q отсутствовал у всех животных, получавших FabA, в стекловидном теле до дня 30.

Исследования токсичности повторных доз

В исследованиях токсичности для глаз при повторных дозах FabA вводили по меньшей мере один раз в 4 недели путем IVT инъекции. Введение повторных доз FabA хорошо переносилось яванскими макаками. В первоначальных токсикологических исследованиях для глаз повторных доз, проведенных на основе GLP, NOAEL для яванских макаков составлял 5 мг/глаз (эквивалентно дозе 10 мг для человека) один раз в месяц для двух доз, наиболее высокой оцененной дозы. В 26-недельном хроническом токсикологическом исследовании для глаз у яванских макаков неблагоприятные изменения глаз были ассоциированы с процедурой двойной инъекции и/или были определены как ADA-опосредованные, а не как прямые эффекты IVT введения FabA, таким образом, NOAEL составил 2,5 мг/глаз (эквивалентно дозе 5 мг для человека) один раз в две недели или один раз в месяц у яванских макаков в количестве 13 или 7 доз соответственно.

6-недельное исследование токсичности для глаз повторных доз FabA, путем интравитреальной инъекции яванским макакам, проведенное на основе GLP

В это исследование включали стандартные параметры безопасности, и образцы крови собирали на протяжении всего исследования. Также собирали терминальные образцы стекловидного тела для ТК и PD анализа и терминальные срезы зрительного нерва для ТК и PD анализа. Кроме того, оценивали OE, IOP, ERG и гистопатологию глаз.

Результаты FabA, признанные не неблагоприятными, были ограничены одной высокой дозой (2,5 мг/глаз) (эквивалентно дозе 5 мг для человека) у самок, у которых наблюдалось минимальное базофильное/голубое окрашивание стекловидного тела без сопутствующего воспаления (так называемая базофилия). Важно отметить, что не было отмечено изменений OE, IOP и ERG, связанных с FabA. ТК подтвердил воздействие FabA

на стекловидное тело всех обработанных животных в течение всего периода исследования и во время выздоровления (через 30 дней после введения последней дозы).

Воздействие на сыворотку крови не поддавалось измерению в дозе 1 мг/глаз (эквивалентно дозе 2 мг для человека), было низким и временным (от 12 до 48 часов после первой дозы, от 6 до 168 часов после последней дозы) в дозе 2,5 мг/глаз (эквивалентно дозе 5 мг для человека) и не превышала 8 нг/мл (LLOQ 1,25 нг/мл). PD подтвердил отсутствие C1q у всех обработанных животных в стекловидном теле, когда уровни FabA составляли ~100 нг/мл. ADA к FabA обнаруживали у животных в дозах 1 мг/глаз (эквивалентно дозе 2 мг для человека) (6 из 12 животных) и 2,5 мг/глаз (эквивалентно дозе 5 мг для человека) (7 из 12 животных), но явное влияние ADA на воздействие FabA в сыворотке крови или стекловидном теле отсутствовало.

6-недельное исследование токсичности для глаз повторных доз FabA, путем интравитреальной инъекции яванским макакам, проведенное на основе GLP

В данном 6-недельном токсикологическом исследовании для глаз яванских макак, проведенном на основе GLP, несущую среду или FabA вводили двусторонне путем IVT инъекции в дозе 5 мг/глаз (эквивалентно дозе 10 мг для человека) каждые четыре недели (в дни 1 и 29) молодым взрослым самцам и самкам яванских макаков с последующим 4-недельным периодом восстановления. Всех животных из основного исследования умерщвляли в день 44, а всех выздоровевших животных умерщвляли в день 59/60. Все и выздоровевшие животные из основного исследования дожили до запланированного вскрытия.

В это исследование включали стандартные параметры безопасности (за исключением системной гистопатологии), и образцы крови собирали на протяжении всего исследования, а также терминальные образцы стекловидного тела для ТК и PD анализа. Образцы ADA и водянистой влаги собирали и архивировали. Кроме того, оценивали OE, IOP, ERG и гистопатологию глаз.

Никаких изменений, связанных с FabA, не отмечали ни в одном оцениваемом параметре безопасности, включая OE, IOP, ERG и гистопатологию глаз. Минимальное или легкое базофильное/голубое окрашивание стекловидного тела без сопутствующего воспаления (обозначаемое как базофилия) наблюдали как у обработанных, так и у контрольных животных и, таким образом, его не считали связанным с FabA.

ТК подтвердил воздействие FabA на стекловидное тело всех обработанных животных в течение всего периода исследования и во время выздоровления (через 30 дней после введения последней дозы). Отсутствие FabA подтверждали в сыворотке крови и стекловидном теле контрольных животных. PD подтвердил отсутствие C1q у всех обработанных животных из основного исследования в стекловидном теле в день 44. В день 59 2/4 выздоравливающих животных имели измеримый уровень C1q в стекловидном теле. ADA к FabA обнаруживали у животных в группе 5 мг/глаз (эквивалентно 10 мг дозы для человека) (9 из 10 животных), но явное влияние ADA на воздействие FabA в сыворотке крови или стекловидном теле отсутствовало.

Ингибирование C1q-зависимого гемолиза на >80% достигалось через 24-48 часов после введения FabA и после этого возвращалось к исходному уровню.

Уровни C1q также были значимо снижены в сетчатке, сосудистой оболочке и диске зрительного нерва в день 44 и продолжали снижаться в сетчатке и сосудистой оболочке, но не в диске зрительного нерва в день 59.

В этом исследовании не наблюдали побочных эффектов, которые считались связанными с FabA, при любом уровне дозы, включая 5 мг/глаз (эквивалентно дозе 10 мг для человека) (наиболее высокая оцениваемая доза). На основании этих результатов NOAEL составил 5 мг/глаз (эквивалентно дозе 10 мг для человека) (2,5 мг/мл в стекловидном теле).

26-недельное исследование токсичности для глаз повторных доз FabA, путем интравитреальной инъекции яванским макакам, проведенное на основе GLP, с 10-недельным периодом восстановления

В данном 26-недельном токсикологическом исследовании для глаз яванских макак, проведенном на основе GLP, несущую среду или FabA вводили двусторонне путем IVT инъекции в дозе 2,5 мг/глаз (эквивалентно дозе 5 мг для человека) один раз в месяц, 5 мг/глаз (эквивалентно 10 мг для человека) один раз в месяц и 5 мг/глаз один раз в две недели (раз в две недели) молодым взрослым самцам и самкам яванских макак с последующим 10-недельным периодом восстановления. Однократная инъекция 50 мкл соответствовала дозе 2,5 мг/глаз или двойная инъекция общим объемом 100 мкл (две инъекции по 50 мкл, разделенные 10 мин введения, соответствовали дозе 5 мг/глаз) один раз в 2 недели (13 периодов введения) или один раз в 4 недели (7 периодов введения). Всех животных из основного исследования умерщвляли в день 184, а всех выздоровевших животных умерщвляли в день 242/243. Все и выздоровевшие животные из основного исследования дожили до запланированного вскрытия.

Перерыв введения дозы или прекращение введения дозы наблюдали у животных в контрольной группе, в группах с дозой 5 мг/глаз (эквивалентно дозе 10 мг для человека) один раз в месяц и в группах с дозой 5 мг/глаз один раз в две недели. Двойные инъекции в этих группах прекращали вследствие неблагоприятных результатов, обнаруженных ОЕ, и их сочли связанными с процедурой и большим объемом дозы. Начиная с дня 71 исследования группа, получавшая 5 мг/глаз один раз в месяц, получала дозу 2,5 мг/глаз (эквивалент дозы 5 мг для человека) один раз в месяц (обозначаемую как 5/2,5 мг/глаз один раз в месяц) и 5 мг/глаз один раз в две недели и дозу 2,5 мг/глаз раз в две недели (обозначаемую как 5/2,5 мг/глаз один раз в две недели). Перерыв введения дозы продолжался в этих группах дозы (включая контрольную) после прекращения двойных инъекций, которые были связанными с процедурами и/или ADA, как описано ниже. В группе, получавшей 2,5 мг/глаз один раз в месяц (группа с низкой дозой), перерыв введения дозы отсутствовал.

В это исследование включали стандартные параметры безопасности (за исключением системной гистопатологии), и образцы крови собирали на протяжении всего

исследования, а также терминальные образцы стекловидного тела для ТК и PD анализа. Образцы ADA и водянистой влаги собирали и архивировали. Кроме того, оценивали ОЕ, IOP, ERG, гистопатологию и иммуногистохимию (ИНС) глаз для обнаружения депонированных иммунных комплексов в глазных яблоках.

Не отмечали изменений, связанных с FabA, в массе тела, потреблении пищи, электроретинографии, тонометрии и клинической патологии.

Клинические признаки и результаты офтальмологического исследования, считающиеся связанными с FabA, ограничивались помутнением глазного яблока (вероятно, вследствие помутнения передней камеры, капсулы хрусталика и/или задней камеры) и наличием клеток и/или пигмента. Наличие этих результатов у животных, у которые не обнаруживали ADA сыворотке крови (4 из 12 животных группы 2, 2 из 12 животных группы 3 и 2 из 12 животных группы 4), указывает на связь с FabA. Результаты, считающиеся связанными с ADA и потенциально связанными с отложением иммунных комплексов, имели тенденцию быть более серьезными и включали водянистую сыпь и наличие помутнения стекловидного тела, измененный зрачковый рефлекс на свет и ослабление сосудов сетчатки.

После IVT введения FabA самцам и самкам обезьян системное воздействие, измеренное по концентрациям FabA в сыворотке крови, было временным, низким и не превышало 86,3 нг/мл после введения дозы в день 85 или 60,81 нг/мл после последней дозы в день 169. ТК подтвердил воздействие FabA у почти всех обработанных животных, которые получали FabA, до дня 169, что соответствовало неопределяемому C1q в стекловидном теле, за исключением некоторых животных с перерывом введения дозы. В день 242/243 после 10-недельного периода восстановления без введения дозы концентрации FabA в стекловидном теле не поддавались измерению, а концентрации C1q определялись во всех обработанных группах. Отсутствие FabA подтверждали в сыворотке крови и стекловидном теле контрольных животных.

Наличие антител к FabA в образцах сыворотки крови подтверждали у 4 из 12 животных группы 1 (контроль), 8 из 12 животных группы 2, 10 из 12 животных группы 3 и 10 из 12 животных группы 4. У двух животных группы 1 положительный результат подтверждали в одной временной точке на животное после дня 1, тогда как положительных по ADA животные, получавшие FabA, идентифицировали в 3 или 4 или более временных точках (всего было собрано 4 или 5 образцов для животных из основного исследования и периода восстановления соответственно). Не выявляли явного влияния ADA на воздействие FabA в сыворотке крови или стекловидном теле.

При терминальной эвтаназии в день 184 микроскопические изменения, соответствующие опосредованному ADA иммунному ответу на FabA, наблюдали в правом глазу в дозах 5/2,5 мг/глаз ежемесячно и один раз в две недели (группы со средней и высокой дозой соответственно). Внутриглазные изменения, связанные с воспалением, включали легкую смешанную клеточную инфильтрацию ресничного тела и стекловидной камеры, фиброз от минимальной до умеренной степени (степень тяжести

пропорциональна частоте дозы) в камере стекловидного тела и дегенерацию задней части хрусталика от минимальной до легкой степени (степень тяжести пропорциональна частоте дозы). Минимальные периваскулярные мононуклеарные клеточные инфильтраты также наблюдали в задней части сетчатки у одной самки в группах лечения в дозе 5/2,5 мг/глаз один раз в две недели и ежемесячно. Инфильтрацию мононуклеарных клеток от минимальной до легкой степени наблюдали в периокулярном лимбе у животных, которым вводили 5/2,5 мг/глаз один раз в две недели и ежемесячно, с тяжестью, пропорциональной частоте введения.

При восстановительной эвтаназии в день 242/243 микроскопические изменения в правом глазу, связанные с опосредованным ADA иммунным ответом на FabA, были ограниченными и незначительными в дозе 5/2,5 мг/глаз в месяц, в то время как дополнительные изменения сохранялись или развивались в дозе 5/2,5 мг/глаз один раз в две недели. Минимальная гистиоцитарная инфильтрация камеры стекловидного тела и сосудистой оболочки глаза и повышенная базофилия камеры стекловидного тела были исключительными для животных, которым вводили FabA в дозе 5/2,5 мг/глаз один раз в две недели и/или ежемесячно при выздоровлении. Эти изменения были аналогичны изменениям, наблюдаемым у контрольных животных при терминальном вскрытии, где их сочли связанными с незначительным воспалением/деструкцией передней части стекловидного тела, связанной с процедурой IVT инъекции. Однако персистенция этих изменений после периода выздоровления, разрешение этих изменений у контрольных животных при выздоровлении и наличие более тяжелых воспалительных изменений при терминальном вскрытии у животных, которым вводили FabA в дозе 5/2,5 мг/глаз один раз в две недели и ежемесячно, свидетельствовали о том, что эти изменения при выздоровлении, скорее всего, представляли собой разрешение воспаления, связанное с опосредованным ADA иммунным ответом на FabA, а не длительными эффектами процедуры инъекции. Минимальная мононуклеарная клеточная инфильтрация периокулярного лимба сохранялась как в дозах 5/2,5 мг/глаз один раз в две недели, так и ежемесячно.

Минимальная смешанная клеточная инфильтрация и фиброз камеры стекловидного тела сохранялись в дозе 5/2,5 мг/глаз один раз в две недели, в то время как умеренное снижение клеточности и гемосидеринового пигмента сетчатки развивались. Минимальная периваскулярная мононуклеарная клеточная инфильтрация сетчатки в области диска зрительного нерва также наблюдалась в дозах 5/2,5 мг/глаз один раз в две недели. Эти изменения также считались вторичными по отношению к опосредованному ADA ответу на FabA.

Патологически неблагоприятные микроскопические изменения считались вторичными по отношению к опосредованному ADA воспалению и включали фиброз в камере стекловидного тела, дегенерацию хрусталика и снижение целлюлярности сетчатки в дозе 5/2,5 мг/глаз один раз в две недели и ежемесячно.

Какие-либо микроскопические изменения, связанные с введением FabA в дозе 2,5

мг/глаз ежемесячно либо при конечной, либо при восстановительной эвтаназии отсутствовали.

Иммуногистохимию проводили для 2 из 12, 4 из 12 и 6 из 12 животных из групп 1, 3 и 4 соответственно. Оценка выявила наличие иммуногистохимически обнаружимых зернистых отложений, содержащих FabA, IgG обезьяны, IgM и/или C3, в левом глазу 4 из 10 обработанных животных при средней дозе 5/2,5 мг/глаз ежемесячно (2 из 4 животных) и высокой дозе 5/2,5 мг/глаз один раз в две недели (2 из 6 животных), отобранных для ИНС. Эти интрамуральные сосудистые отложения присутствовали в ассоциации с периваскулярными воспалительными клеточными инфильтратами, подобными тем, которые наблюдали при оценке правого глаза гематоксилином и эозином. Другие микроскопические изменения, наблюдаемые в правом глазу, соответствовали вторичным изменениям, ассоциированным с этим иммунным ответом на FabA у обезьяны. Хотя отложения иммунных комплексов в глазу не наблюдали у всех животных, отобранных для иммуногистохимии, в том числе у некоторых с отрицательным статусом ADA в сыворотке крови, это не было неожиданностью, поскольку идентификация отложений может варьироваться в зависимости от срезов тканей, а ADA в сыворотке крови не всегда присутствуют у животных с микроскопическими признаками, соответствующими патологии иммунных комплексов. Кроме того, у некоторых животных с многократными перерывами введения дозы ADA и/или иммунные комплексы могли подвергаться клиренсу до проведения анализов. Наличие иммуногистохимически подтвержденных отложений даже у части животных считалось наиболее убедительным доказательством того, что аналогичная и патогенетически согласованная патология, наблюдаемая в правом глазу, вероятно, связана с иммунным ответом на FabA.

В данном 26-недельном хроническом токсикологическом исследовании для глаз у яванских макак неблагоприятные изменения глаз определяли как связанные с процедурой двойной инъекции и/или опосредованные ADA, а не прямым эффектом IVT введения FabA, таким образом, NOAEL был определен как 2,5 мг/глаз (эквивалентно дозе 5 мг для человека) один раз в две недели или один раз в месяц у яванских макаков в количестве 13 или 7 доз соответственно.

Пример 2: Оценка FabA в клинических исследованиях

Лекарственный препарат FabA представляет собой стерильную изотоническую жидкость для IVT инъекции. Первое открытое исследование фазы 1 с повышением дозы у человека (FabA-GLA-01) проводили для оценки начальной безопасности и переносимости однократной IVT инъекции FabA у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой.

Рандомизированное двойное слепое исследование фазы 1b (FabA-GLA-02) проводили для оценки безопасности и переносимости повторных IVT инъекций FabA у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой.

Результаты обоих исследований показали, что однократные (1-5 мг/глаз) (эквивалентно дозе 2-10 мг для человека) и повторные IVT дозы (2,5 и 5 мг/глаз, 2 дозы, разделенные периодом в 4 недели) FabA хорошо переносились пациентами с глаукомой; о

серьезных или значимых нежелательных явлениях (АЕ) не сообщалось. АЕ в отношении у пациентов, получавших FabA в этих исследованиях, включали гиперемию конъюнктивы, кровоизлияние в конъюнктиву и раздражение глаз, и возникали только в обработанном глазу. В исследовании фазы 1b АЕ в отношении глаз у пациентов из группы имитации включали боль в глазах, ощущение инородного тела в глазах, гиперемию глаз и нечеткость зрения. Системных АЕ, которые считались связанными с IVT лечением FabA, не возникало.

Однократные IVT инъекции в дозе 2,5 мг (эквивалентно дозе 5 мг для человека) и 5 мг (эквивалентно дозе 10 мг для человека) FabA ингибировали свободный C1q в течение по меньшей мере 29 дней в водянистой влаге (исследование FabA-GLA-02).

Фармакокинетика и фармакодинамика у человека

Фармакокинетика и фармакодинамика в глазах

FabA-GLA-02 представляет собой исследование фазы 1b, в котором брали образцы водянистой влаги для оценки РК и PD. Субъектам вводили две IVT инъекции имитационного контроля, 2,5 мг/глаз FabA (эквивалентно 5 мг дозы для человека) или 5 мг/глаз (эквивалентно 10 мг дозы для человека) FabA с интервалом в 29 дней. В данном исследовании образец водянистой влаги брали до введения дозы и через 29 дней после введения первой дозы FabA, до введения второй дозы. Свободный FabA обнаруживали в водянистой влаге всех получавших лечение пациентов в день 29 день (Д29). Параллельно оба уровня дозы 2,5 мг/глаз и 5 мг/глаз FabA ингибировали свободный C1q в течение по меньшей мере 29 дней в водянистой влаге (фигура 6).

Системная фармакокинетика и фармакодинамика

FabA-GLA-01 представляет собой исследование фазы 1 однократной дозы, в котором образцы FabA и C1q сыворотки крови отбирали до введения дозы и через 3 часа после ее введения. FabA-GLA-02 представляет собой многодозовое исследование фазы 1b, в котором образцы сыворотки крови и FabA и C1q отбирали перед введением дозы и через 3 часа после введения каждой из 2 доз, разделенных 29 днями. Как правило, FabA не обнаруживался в системном кровотоке после однократных или повторных IVT инъекций при любом уровне дозы, изученном в клинических исследованиях фазы 1 или фазы 1b. Аналогично ни в одном из исследований не обнаруживали изменений в циркулирующем свободном C1q.

Как описано ниже, уровень дозы 5 мг/глаз (эквивалент дозы для человека 10 мг) хорошо переносился при однократном или двукратном введении с интервалом 29 дней в клинических исследованиях FabA. Как описано выше, в исследовании фазы 1b однократные дозы FabA 2,5 мг (эквивалентно дозе 5 мг для человека) и 5 мг (эквивалентно дозе 10 мг для человека) ингибировали свободный C1q в водянистой влаге в течение по меньшей мере 29 дней (фигура 6).

Безопасность и эффективность

Повышение дозы в фазе 1 (FabA-GLA-01)

Это было открытое исследование фазы 1 с повышением дозы, в котором оценивали

безопасность/переносимость и РК однократной IVT инъекции FabA у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой. Подходящими пациентами были взрослые со средним отклонением от 3 до 18 дБ в надежном тесте поля зрения, которые могли выполнить надежный тест поля зрения в исследуемом глазу с пороговым значением 33% для потерь фиксации и 33% для частоты ложноположительных ответов с использованием быстрой версии 24-2 шведского интерактивного порогового алгоритма анализатора поля Хамфри (HFA-SITA), и имели IOP <21 мм рт.ст. при стабильном режиме лечения IOP в исследуемом глазу в течение ≥ 4 недель до введения дозы. Девять пациентов разделяли на 3 когорты, по 3 пациента, включенных в каждую группу следующим образом:

- Когорта 1=1,0 мг/глаз, однократная доза (0,02 мл) \times 1 доза
- Когорта 2=2,5 мг/глаз, однократная доза (0,05 мл) \times 1 доза
- Когорта 3=5,0 мг/глаз, однократная доза (0,10 мл) \times 1 доза

После скрининга 3 подходящих пациентов включали в открытую когорту с наиболее низкой дозой, при этом регистрация в следующей когорте начиналась только после того, как была продемонстрирована переносимость и краткосрочная безопасность предыдущей более низкой дозы. Все пациенты в каждой когорте должны были пройти как минимум 15-дневный период наблюдения за безопасностью, прежде чем пациентам из следующей когорты можно было делать инъекции. В ходе исследования не сообщалось о дозолIMITирующей токсичности (DLT).

Девять пациентов включали, лечили и они завершили исследование.

Безопасность

Нежелательные явления в отношении глаз, возникающие при лечении (TEAE), включали гиперемию конъюнктивы (все уровни доз), кровоизлияние в конъюнктиву (только 2,5 мг/глаз) и раздражение глаз (только 1 мг/глаз) и возникали только в исследуемом глазу.

Единственным системным TEAE, испытанным в исследовании, был синусит.

- Все TEAE были легкой степени тяжести.
- Серьезные или значимые TEAE отсутствовали.
- Ни один пациент не прекратил лечение или не покинул исследование вследствие TEAE.

- IOP вернулось к норме (в пределах 5 мм рт.ст. от IOP непосредственно перед инъекцией или < 21 мм рт.ст.) в течение 30 минут у 9 из 9 пациентов.

- Ни у одного пациента не было выявлено каких-либо признаков наличия антител к FabA.

Общее обобщение/выводы:

В этом исследовании пациенты со стабильной глаукомой хорошо переносили однократные IVT дозы FabA до 5 мг/глаз. Сообщаемые АЕ в отношении глаз были аналогичны таковым при IVT введении одобренных лекарственных средств. Никаких сигналов безопасности в отношении FabA не наблюдали.

FabA, как правило, не обнаруживался в системном кровотоке, и не было

обнаружено никаких изменений в циркулирующем свободном С1q после однократного IVT введения.

Фаза 1b (FabA-GLA-02)

Это было двойное слепое, рандомизированное, плацебо-контролируемое исследование для оценки двух уровней дозы FabA по сравнению с инъекцией имитационного контроля, вводимой в виде повторных IVT инъекций у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой. Подходящими пациентами были взрослые со средним отклонением от -3 до -24 дБ при надежном тесте поля зрения в исследуемом глазу, которые были в состоянии выполнить надежный тест поля зрения в исследуемом глазу с пороговым значением 33% для потерь фиксации и 33% для ложноположительных ответов с использованием быстрой версии HFA-SITA, IOP <21 мм рт.ст. при скрининге и в день 1 и получавших стабильную схему лечения IOP в течение ≥ 4 недель до инъекции, без ожидаемого изменения в схеме лечения IOP режим во время исследования. Пациенты получали две инъекции с интервалом в 4 недели и их наблюдали в общей сложности в течение 12 недель для оценки безопасности, переносимости, PK, PD, иммуногенности и текущих исследовательских оценок. Пациентов случайным образом распределяли (1:1:1) в одну из 3 когорт (планировали 5 пациентов в когорте) следующим образом:

- Уровень дозы 1=2,5 мг/глаз, однократная доза (0,05 мл) \times 2 дозы
- Уровень дозы 2=5,0 мг/глаз, однократная доза (0,10 мл) \times 2 дозы
- Имитация=0 мг/глаз \times 2 дозы

Восемнадцать пациентов рандомизировали (7 в группу 2,5 FabA, 5 в группу 5,0 мг FabA и 6 в группу имитационного контроля) и 17 пациентов получали лечение. Одного пациента в группе дозы 2,5 мг рандомизировали, но не лечили. Шестнадцать пациентов завершили исследование.

Безопасность

ТЕАЕ в отношении глаз у пациентов, получавших FabA, включали гиперемию конъюнктивы (2,5 и 5 мг/глаз), кровоизлияние в конъюнктиву (только 5 мг/глаз) и раздражение глаз (только 5 мг/глаз); ни одно из этих ТЕАЕ не наблюдали у пациентов в группе имитационного контроля. ТЕАЕ в отношении глаз в группе имитационного контроля включали боль в глазах, ощущение инородного тела в глазах, гиперемию глаз и нечеткость зрения и каждое наблюдали у 1 пациента.

В исследовании наблюдали системные ТЕАЕ; ни одно из них не сочли исследователем связанным с исследуемым лечением.

- Все ТЕАЕ были легкой степени тяжести.
- Все зарегистрированные ТЕАЕ, кроме одного, произошли после введения первой дозы, но до второго введения исследуемого препарата.
- Серьезные или значимые ТЕАЕ отсутствовали.
- Ни один пациент не прекратил лечение или не покинул исследование вследствие ТЕАЕ.
- IOP нормализовалось (<21 мм рт.ст.) у 16/17 пациентов в течение 30 минут после

IVT инъекции и в течение 45 минут у остальных пациентов.

- Из 11 пациентов, которым интравитреально вводили FabA, 6 пациентов дали положительный результат в течение по меньшей мере одной временной точки. Один пациент был положительным по ADA с умеренным повышением титра с течением времени, а остальные 5 пациентов были положительными во всех временных точках, включая до введения дозы, без каких-либо изменений титра с течением времени. Один пациент с введением имитационного контроля был положительным по ADA во всех временных точках, в том числе до введения дозы, без каких-либо изменений титра с течением времени. Совместно эти данные указывают на неясную связь между измерением ADA и введением FabA.

Общее обобщение/выводы:

У пациентов со стабильной глаукомой 2 IVT дозы FabA, разделенные 4 неделями, хорошо переносились до 5 мг/глаз. Сообщаемые АЕ в отношении глаз были аналогичны таковым при IVT введении одобренных лекарственных средств. В данном исследовании никаких сигналов безопасности в отношении FabA не наблюдали.

Однократные IVT дозы FabA (2,5 и 5 мг/глаз) ингибировали свободный C1q в водянистой влаге в течение по меньшей мере 29 дней.

Пример 3: Многоцентровое, рандомизированное, параллельное групповое, двойное маскирование, 4 группы, плацебо-контролируемое исследование фазы 2 эффективности, безопасности и переносимости FabA, вводимого путем интравитреальной инъекции, у пациентов с географической атрофией (GA), вторичной по отношению к возрастной макулодистрофии (AMD)

Обоснование:

Краткое обобщение:

Это исследование проводится у пациентов с GA, вторичной по отношению к AMD. Целью исследования является определение того, снижают ли интравитреальные (IVT) инъекции FabA один раз в месяц (EM) или один раз в два месяца (EOM) в течение 12 месяцев скорость роста поражения вследствие GA. Исследование состоит из 30-дневного скринингового периода и 12-месячного периода лечения, за которым следует 6-месячный период наблюдения (без лечения). Общая продолжительность участия пациентов составляет 19 месяцев. Пациенты посещают клинику каждый месяц в течение 12-месячного периода лечения для оценок лечения и/или безопасности.

Примерно 240 пациентов включали и случайным образом распределяли в одну из 4 групп лечения, так что примерно 204 пациента могут быть оценены через 12 месяцев для первичного анализа (первичный анализ основан на модифицированной группе пациентов, которым назначено лечение [ITT]).

Группы воздействия и продолжительность:

Назначение исследуемого воздействия основано на рандомизации (2:2:1:1). Пациентов распределяют в одну из следующих групп лечения. Уровень дозы фиксирован и не модифицируется.

- Группа 1=FabA 5,0 мг/глаз (0,10 мл) один раз в месяц (ЕМ) в течение 12 месяцев (12 доз)
- Группа 2=FabA 5,0 мг/глаз (0,10 мл) один раз в два месяца (ЕОМ) в течение 12 месяцев (6 доз)
- Группа 3=Инъекции имитационного контроля ЕМ в течение 12 месяцев (12 инъекций имитационного контроля)
- Группа 4=Инъекции имитационного контроля ЕОМ в течение 12 месяцев (6 инъекций имитационного контроля)

Инъекция

Введение FabA/имитационного контроля осуществляется врачом, выполняющим инъекцию, с использованием асептической техники.

Все пациенты, рандомизированные в группу FabA, получают в дозе 5,0 мг/глаз IVT (в фиксированном объеме 0,10 мл) один раз в месяц или один раз в два месяца в течение 12 месяцев.

Период после инъекции

Непосредственно после введения лекарственного средства врач, выполняющий инъекцию, оценивает зрение при движении руки или визуализацию перфузии центральной артерии сетчатки. При необходимости исключите другие причины потери зрения, такие как кровоизлияние в стекловидное тело. При необходимости проведите пальцевой массаж и назначьте лекарственные препараты для местного/перорального применения, снижающие ИОР, до тех пор, пока не будет наблюдаться движение руки или перфузия центральной артерии сетчатки.

ИОР (тонометрия) оценивают только в исследуемом глазу, через 30 минут после введения лекарственного средства и, если оно повышено, каждые 15 минут после этого до тех пор, пока ИОР не станет < 25 мм рт.ст.

Фармакокинетика, фармакодинамика и иммуногенность

Образцы крови для РК (концентрация FabA в сыворотке крови) и PD оценок (концентрация C1q в сыворотке крови и концентрация других биомаркеров в плазме крови) собирают в течение 30 минут перед введением дозы и через 3 часа (± 15 мин) после введения дозы во время визитов.

Образцы для тестирования на иммуногенность (ADA) собирают перед инъекцией во время визитов в исследовательский центр. Кроме того, образец для оценки ADA берут на неделе 2 в исследовательском центре или при визите врача на дом.

Фармакокинетика: для данного теста требуется сыворотка крови. Образцы крови собирают для измерения концентрации FabA в сыворотке крови.

Фармакодинамика: для данного теста требуются сыворотка крови и плазма крови. Анализируют концентрации C1q в сыворотке крови и концентрации исследовательских биомаркеров системы комплемента в плазме крови.

Иммуногенность: для данного теста требуется сыворотка крови. Иммуногенность оценивают путем анализа сывороточных антител к лекарственным (FabA) препаратам

(ADA).

ПРОЦЕДУРА ИНТРАВИТРАЛЬНОЙ ИНЪЕКЦИИ

Приготовление FabA

Отберите весь объем FabA (примерно 0,3 мл) из стерильного флакона FabA с помощью стерильного шприца объемом 1,0 см кубических с помощью фильтрующей иглы 19-го калибра × 1-1/2 дюйма, 5 микрон.

Замените иглу фильтра инъекционной иглой 30-го калибра × 1/2 дюйма. Удалите избыточный объем FabA из шприца непосредственно перед инъекцией, оставив в шприце только необходимый объем для инъекции.

Объем дозы FabA установлен на уровне 0,10 мл один раз в месяц (EM) в течение 12 месяцев (12 доз) или один раз в два месяца (EOM) в течение 12 месяцев (6 доз).

Подготовка к интравитреальной инъекции

1. Проверьте исследуемый глаз.
2. Измерьте и запишите предоперационное внутриглазное давление (IOP) в исследуемом глазу перед инъекцией. Выполните тонометрию только на исследуемом глазу. Чтобы продолжить, IOP должно составлять ≤ 21 мм рт.ст. Если > 21 мм рт.ст., перенесите инъекцию FabA и контролируйте IOP по усмотрению исследователя.

3. Нанесите 1 каплю офтальмологического раствора гидрохлорида фенилэфрина 2,5% для местного применения на исследуемый глаз за 30 минут до инъекции, чтобы обеспечить визуализацию заднего полюса глаза после инъекции, при необходимости.

4. Непосредственно перед инъекцией:

- Попросите пациента лечь на спину в кресле для осмотра, хорошо поддерживая шею.

Интравитреальная инъекция

1. Для инъекции требуется мытье рук, стерильные перчатки и хирургическая маска.
2. Нанесите местно 0,5% пропаракаин на исследуемый глаз.
3. Нанесите 10% повидон-йод на ресницы и края век. Избегайте обширного массажа век до или после инъекции, чтобы избежать проявления мейбомиевых желез.

4. Отведите веки от предполагаемого места инъекции на время процедуры. Рекомендуется использовать зеркало.

5. Нанесите повидон-йод 5% на поверхность конъюнктивы, включая предполагаемое место инъекции.

6. Для инъекции FabA: введите иглу перпендикулярно склере, на 3,5-4 мм кзади от лимба, между вертикальной и горизонтальной прямой мышцей. Нанесите стерильный ватный аппликатор на место инъекции непосредственно после извлечения иглы, чтобы уменьшить рефлюкс в стекловидное тело.

7. Инъекции имитационного контроля: подготовка и уход после инъекции имитационного контроля идентичны инъекциям FabA. Инъекция имитационным контролем выполняется путем давления на глаз в месте типичной интравитреальной инъекции с использованием тупого конца пустого шприца без иглы.

После интравитреальной инъекции

1. Пациенты должны оставаться в клинике после инъекции для осмотра глаз и последующего наблюдения в отношении безопасности.

2. Незамедлительно оцените зрение при движении рук или перфузию центральной артерии сетчатки и исключите другие причины потери зрения, такие как кровоизлияние в стекловидное тело. Проведите пальцевой массаж и назначьте лекарственные препараты для местного/перорального применения, снижающие ИОП, до тех пор, пока не будет наблюдаться движение рук или перфузия центральной артерии сетчатки, если не будет найдена другая причина.

3. Измерьте ИОП в исследуемом глазу только через 30 минут после инъекции и, если оно повышено, каждые 15 минут до тех пор, пока ИОП не станет < 25 мм рт.ст. Внутриглазное давление, превышающее 30 мм рт.ст. в течение более 15 минут, лечат по усмотрению врача.

4. Местные антибиотики не требуются.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

Каждое из патентов, опубликованных заявок на патент и непатентных ссылок, цитируемое в данном документе, тем самым включено посредством ссылки во всей своей полноте.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Специалистам в данной области техники станет понятно или они смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, существование многочисленных эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в данном документе. Такие эквиваленты должны охватываться следующей формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения болезни глаз у пациента-человека, включающий введение пациенту композиции, содержащей от около 1 мг до около 10 мг антитела к С1q, посредством интравитреальной инъекции,

где антитело содержит переменный домен легкой цепи, содержащий HVR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HVR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и HVR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и переменный домен тяжелой цепи, содержащий HVR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, HVR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и HVR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

2. Способ по п. 1, в котором антитело содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 95% гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 4 и 35-38, и в котором переменный домен легкой цепи содержит HVR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HVR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и HVR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

3. Способ по п. 2, в котором переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4 и 35-38.

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 95% гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 8 и 31-34, и в котором переменный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, HVR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и HVR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

5. Способ по п. 4, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8 и 31-34.

6. Способ по любому из пп. 1-5, в котором антитело представляет собой моноклональное антитело, гуманизованное антитело, человеческое антитело, химерное антитело, фрагмент антитела или производное антитела.

7. Способ по п. 6, в котором антитело представляет собой фрагмент антитела, а фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fv, диатело или молекулу одноцепочечного антитела.

8. Способ по п. 7, в котором фрагмент Fab содержит фрагмент Fab тяжелой цепи SEQ ID NO: 39 и фрагмент Fab легкой цепи SEQ ID NO: 40.

9. Способ по любому из пп. 1-8, в котором антитело вводят один раз в неделю.

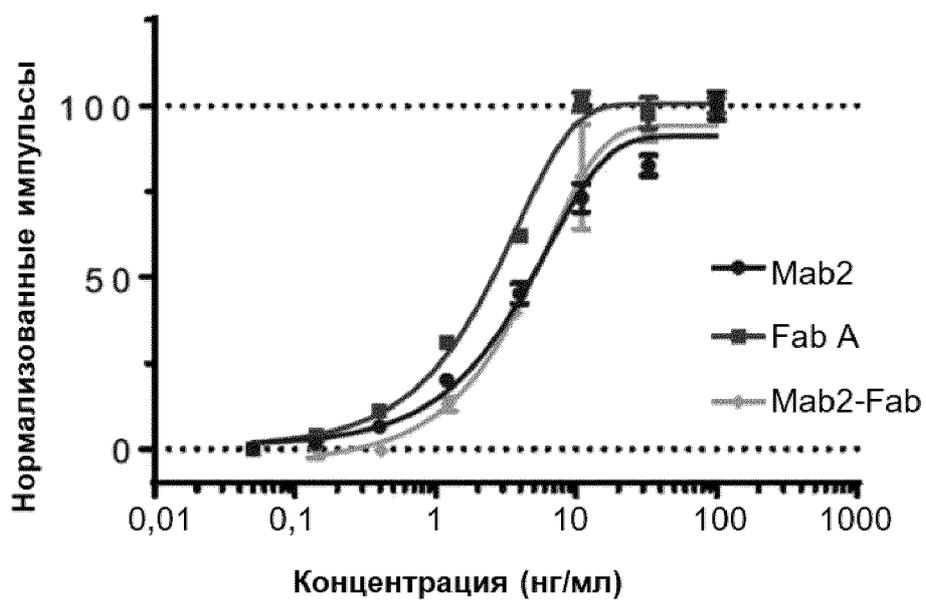
10. Способ по любому из пп. 1-8, в котором антитело вводят один раз в две недели.

11. Способ по любому из пп. 1-8, в котором антитело вводят один раз в три недели.

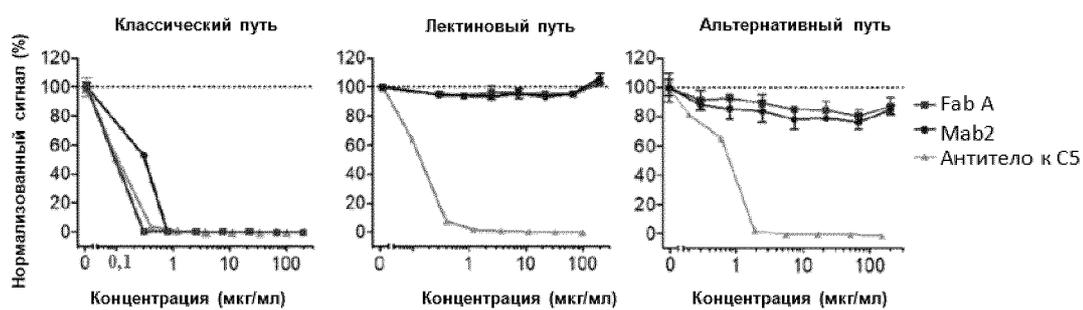
12. Способ по любому из пп. 1-8, в котором антитело вводят один раз в месяц.
13. Способ по любому из пп. 1-8, в котором антитело вводят один раз в четыре недели.
14. Способ по любому из пп. 1-8, в котором антитело вводят один раз в шесть недель.
15. Способ по любому из пп. 1-8, в котором антитело вводят один раз в 8 недель.
16. Способ по любому из пп. 1-8, в котором антитело вводят один раз в два месяца.
17. Способ по любому из пп. 1-8, в котором антитело вводят один раз в 10 недель.
18. Способ по любому из пп. 1-8, в котором антитело вводят один раз в 12 недель.
19. Способ по любому из пп. 1-8, в котором антитело вводят один раз в три месяца.
20. Способ по любому из пп. 1-8, в котором антитело вводят один раз в 4 месяца.
21. Способ по любому из пп. 9-20, в котором антитело вводят в течение по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев или по меньшей мере 12 месяцев.
22. Способ по любому из пп. 9-21, в котором антитело вводят в течение 12 месяцев.
23. Способ по любому из пп. 1-22, в котором вводимая композиция содержит около 1 мг, около 1,5 мг, около 2 мг, около 2,5 мг, около 3 мг, около 3,5 мг, около 4 мг, около 4,5 мг, около 5 мг, около 5,5 мг, около 6 мг, около 6,5 мг, около 7 мг, около 7,5 мг, около 8 мг, около 8,5 мг, около 9 мг, около 9,5 мг или около 10 мг антитела к С1q.
24. Способ по любому из пп. 1-23, в котором композиция включает введение около 1 мг антитела к С1q.
25. Способ по любому из пп. 1-23, в котором композиция включает введение около 2,5 мг антитела к С1q.
26. Способ по любому из пп. 1-23, в котором композиция включает введение около 5 мг антитела к С1q.
27. Способ по любому из пп. 1-23, в котором композиция включает введение около 2 мг антитела к С1q.
28. Способ по любому из пп. 1-23, в котором композиция включает введение около 5 мг антитела к С1q.
29. Способ по любому из пп. 1-23, в котором композиция включает введение около 10 мг антитела к С1q.
30. Способ по любому из пп. 1-23, в котором композиция включает введение от около 1 мг до около 2,5 мг, от около 2,5 мг до около 5 мг, от около 5 мг до около 7,5 мг или от около 7,5 мг до около 10 мг антитела к С1q.
31. Способ по любому из пп. 1-30, в котором болезнь глаз представляет собой глаукому или возрастную макулодистрофию.
32. Способ по п. 31, в котором возрастная макулодистрофия представляет собой географическую атрофию.

По доверенности

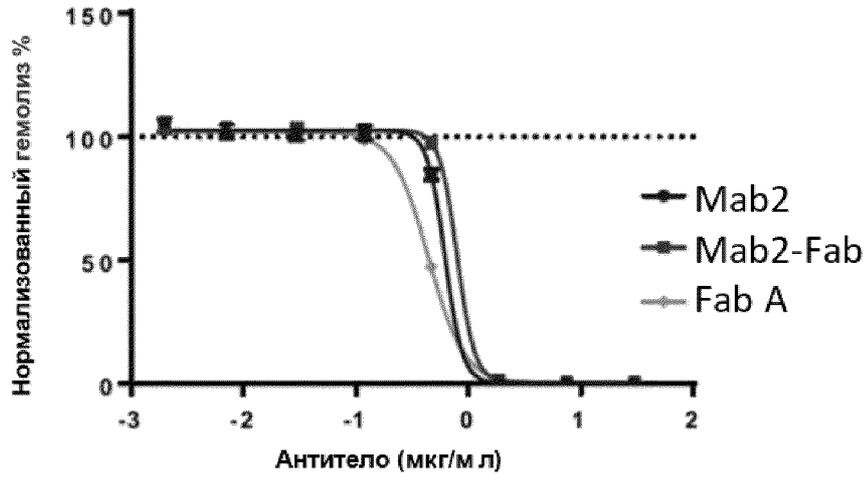
1/4



Фиг. 1



Фиг. 2



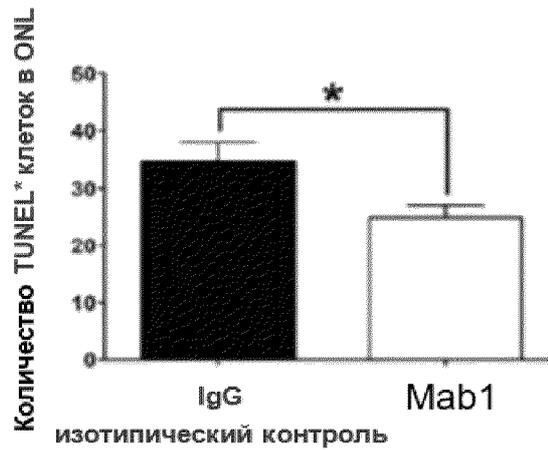
Фиг. 3



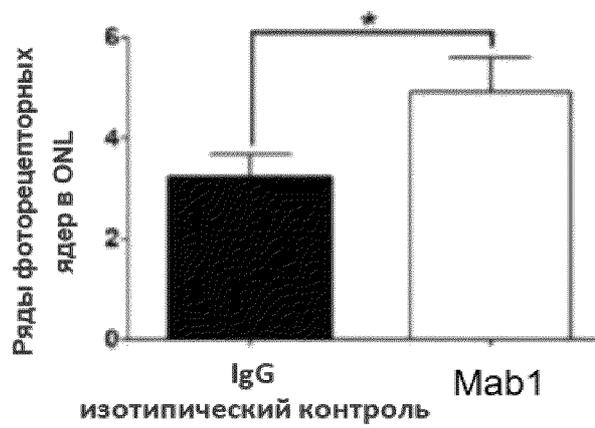
Фиг. 4



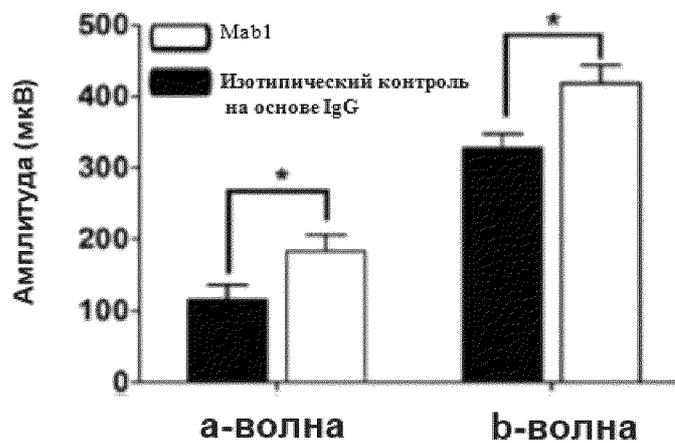
Фиг. 5А



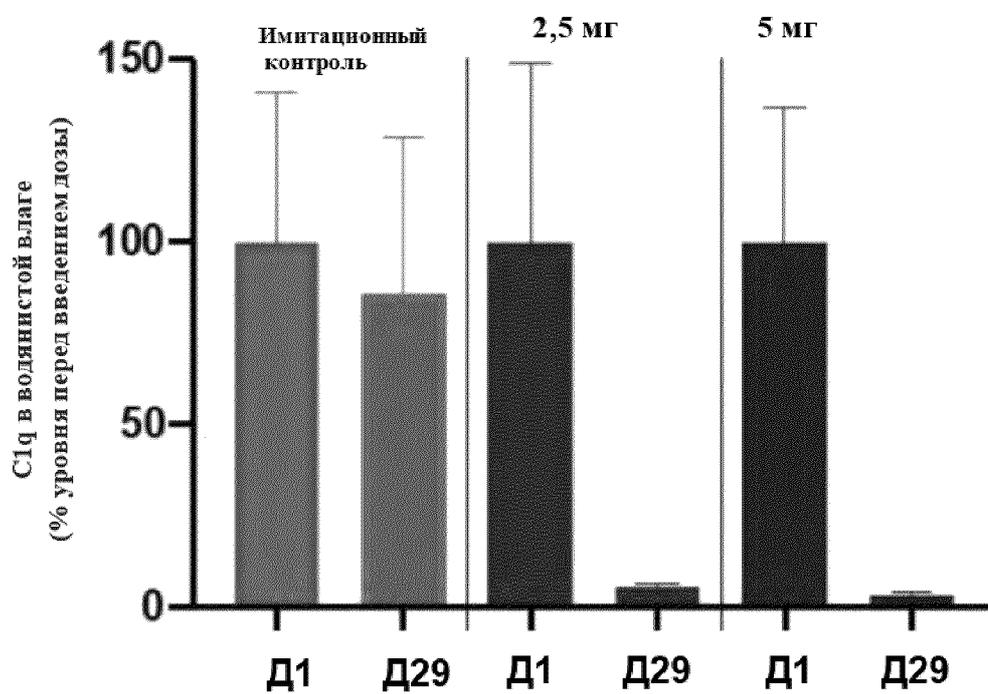
Фиг. 5В



Фиг. 5С



Фиг. 5D



Фиг. 6