



MD/EP 3468990 T2 2024.11.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3468990 (13) T2

- (51) Int. Cl: C07K 16/18 (2006.01.01)
A61K 39/00 (2006.01.01)
A61P 1/04 (2006.01.01)
A61P 3/10 (2006.01.01)
A61P 9/00 (2006.01.01)
A61P 9/10 (2006.01.01)
A61P 11/00 (2006.01.01)
A61P 11/06 (2006.01.01)
A61P 13/00 (2006.01.01)
A61P 13/10 (2006.01.01)
A61P 13/12 (2006.01.01)
A61P 17/02 (2006.01.01)
A61P 19/02 (2006.01.01)
A61P 21/04 (2006.01.01)
A61P 25/00 (2006.01.01)
A61P 25/08 (2006.01.01)
A61P 25/16 (2006.01.01)
A61P 25/28 (2006.01.01)
A61P 27/02 (2006.01.01)
A61P 29/00 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 0468 (22) Data de depozit: 2017.06.13 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17731785.6, 2017.06.13 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3468990, 2019.04.17 (31) Numărul cererii prioritare: 201662349705 P; 201662405561 P; 201662422107 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.06.14; 2016.10.07; 2016.11.15 (33) Țara cererii prioritare: US; US; US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 11/2024, 2024.11.30 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 13/2024, 2024.03.27 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 05/2019, 2019.05.31
(71) Solicitant: REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., US (72) Inventatori: HU Ying, US; LATUSZEK Adrianna, US; ROMANO Carmelo, US; OLSON William, US (73) Titular: REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., US (74) Mandatar autorizat: LAZICOV Tatiana	

(54) Anticorpi anti-C5 și utilizările acestora

MD/EP 3468990 T2 2024.11.30

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la anticorpi monoclonali care se leagă de proteina 5 (C5) a sistemului complement și la metode de utilizare a acestora. În diferite realizări ale invenției, anticorpii reprezintă anticorpi complet umani, care se leagă de proteina C5. În unele realizări, anticorpii prezentei invenții sunt utili pentru inhibarea sau neutralizarea activității C5, oferind astfel un mijloc de tratare sau prevenire a unei boli sau tulburări legate de C5 la om.

În unele realizări, invenția prevede un anticorp anti-C5, care are proprietăți farmacocinetice și farmacodinamice îmbunătățite, de exemplu, un timp de înjumătățire depășind 10 zile.

Revendicări: 12

Figuri: 16

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de titular)****DOMENIUL INVENTIEI**

Prezenta invenție se referă la anticorpi și fragmente de anticorpi de legare la antigen care se leagă în mod specific la factorul complementar C5 și metode terapeutice și de diagnostic de utilizare a acelor anticorpi.

STADIUL TEHNICII AL INVENȚIEI

Sistemul complement este un grup de proteine plasmatice care, atunci când sunt activate, conduc la liza celulelor țintă și facilitează fagocitoza prin opsonizare.

Complementul este activat printr-o serie de etape proteolitice prin trei căi majore: calea clasică, care este de obicei activată de complexe imune, calea alternativă care poate fi indusă de suprafețele celulare neprotejate și calea lectinei de legare a manozei. Toate cele trei căi ale cascadei complementului converg către clivajul proteolitic al proteinei componente 5 a complementului (C5). Scindarea componente 5 (C5) are ca rezultat producerea fragmentelor C5a și C5b, un proces care este critic în timpul activării cascadei complementului. C5a poate genera răspunsuri fiziologice pleiotrope prin legarea la receptorii săi (Monk și colab. 2007, Br. J. Pharmacol. 152: 429-448). C5a este un mediator pro-inflamator puternic care induce migrarea chemotactică, îmbunătățește aderența celulară, stimulează explozia oxidativă și induce eliberarea diferiților mediatori inflamatori, cum ar fi histamina sau citokinele. C5b mediază formarea complexului de atac al membranei (MAC, sau C5b-9) care duce la liza celulară în fazele târzii ale citotoxicității dependente de complement (CDC). În plus, în celulele nucleate care sunt rezistente la citoliză de către C5b-9, cantitățile sublitice de C5b-9 pot provoca activarea celulară care are ca rezultat proliferarea celulară, generarea de mediatori proinflamatori și producerea de matrice extracelulară.

Anticorpii monoclonali împotriva C5 sunt cunoscuți în domeniu și au fost descriși, de exemplu, în brevetele US/Publicația nr. 9206251, 9107861, 9079949, 9051365, 8999340, 8883158, 8241628, 7999081, 7432356, 7361339, 7279158, 6534058, 6355245, 6074642, 20160299305, 20160051673, 20160031975, 20150158936, 20140056888, 20130022615, 20120308559, and in WO2015198243, WO2015134894, WO2015120130, EP2563813B1, EP2328616B1, și EP2061810B1.

EP2328616B1 se referă la anticorpi care vizează proteina complementului C5 și compozițiile și metodele de utilizare ale acesteia. Wong și colab., Transl Res. 2015, 165(2):306-320 se referă la terapia anticomplementară C5 cu eculizumab pentru tratamentul hemoglobinuriei nocturne paroxistice și sindromului hemolitic uremic atipic. WO 2014/047500 A1 se referă la teste de screening pentru antagoniștii C5 ai componente 5 complementului.

Anticorpii compleți umani care se leagă în mod specific la proteina C5 cu afinitate mare și au proprietăți farmacocinetice îmbunătățite ar putea fi importanți în prevenirea și tratamentul diferitelor boli asociate cu C5 (de exemplu, sindromul hemolitic uremic atipic).

SCURT REZUMAT AL INVENȚIEI

Prezenta invenție furnizează anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen care leagă în mod specific proteina factorului complement 5 (C5). Anticorpii conform invenției cuprind o regiune variabilă a lanțului greu (HCVR) care cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 98 și o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR) care cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 106. Prezenta invenție furnizează de asemenea o compoziție farmaceutică care cuprinde anticorpii sau fragmentul de legare la antigen al acestuia și un purtător sau diluant acceptabil farmaceutic; un dispozitiv de livrare a stiloului injector (pen) reutilizabil care cuprinde compoziția farmaceutică; un dispozitiv de eliberare cu autoinjector care cuprinde compoziția farmaceutică; o moleculă de polinucleotidă izolată cuprinzând o secvență de nucleotide care codifică o HCVR a anticorpului sau fragmentul acestuia de legare la antigen și o secvență de nucleotide care codifică un LCVR a unui anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia; un vector care cuprinde polinucleotida; și o celulă care exprimă vectorul. Prezenta invenție furnizează, de asemenea, anticorpii sau fragmentul de legare la antigen al acestuia pentru utilizare într-o metodă de prevenire, tratare sau ameliorare a cel puțin unui simptom sau indicație a unei boli sau tulburări selectate din grupul constând din sindromul hemolitic uremic atipic (aHUS), paroxistic. hemoglobinurie nocturnă (PNH), degenerescență maculară legată de vârstă, atrofie geografică, uveită, neuromielita optică, scleroză multiplă, accident vascular cerebral, sindrom Guillain Barre, leziuni cerebrale traumatiche, boala Parkinson, o tulburare de activare inadecvată sau nedorită a complementului, o complicație a hemodiei hiperacute respingerea alogrefei, respingerea xenogrefei, toxicitatea indusă de interleukină-2 în timpul terapiei cu IL-2, o tulburare inflamatorie, inflamația unei boli autoimune, boala Crohn, sindromul de detresă respiratorie a adultului, leziuni termice, o arsură, degerături, o afecțiune post-ischemică de reperfuzie, infarct miocardic, sindrom de scurgere capilară, obezitate, diabet, boala

Alzheimer, schizofrenie, epilepsie, ateroscleroză, vasculită, pemfigoid bulos, glomerulopatie C3, glomerulonefrită membranoproliferativă, nefropatie diabetică, sindrom Alport, insuficiență renală renală progresivă, insuficiență renală proteinurică și renală progresivă leziune, nefrită lupică, angioplastie cu balon, sindrom post-pompă în bypass cardiopulmonar sau bypass renal, ischemie renală, reperfuzie a arterei mezenterice după reconstrucția aortică, boală infecțioasă, sepsis, o tulburare a complexului imun, o boală autoimună, o afecțiune renală, artrită reumatoidă, lupus eritematos sistemic (LES), nefrită LES, nefrită proliferativă, anemie hemolitică, astm, boală pulmonară obstructivă cronică (BPOC), emfizem, embolie pulmonară, infarct pulmonar, pneumonie și miastenia gravis. Anticorpul prezentei invenții sunt utili, inter alia, pentru inhibarea sau neutralizarea activității proteinei C5. în anumite variante de realizare, anticorpul sunt utili în prevenirea, tratarea sau ameliorarea a cel puțin unui simptom sau indicație a unei boli sau tulburări asociate cu C5 la un subiect. în anumite variante de realizare, anticorpul pot fi administrați profilactic sau terapeutic unui subiect care are sau riscă să aibă o boală sau tulburare asociată cu C5. în anumite realizări, anticorpul anti-C5 sunt anticorpi complet umani care se leagă la C5 cu afinitate mare și au proprietăți farmacocinetice (PK) și farmacodinamice (PD) îmbunătățite. Astfel de anticorpi de mare afinitate cu PK/PD îmbunătățit pot fi utilizați pentru a oferi o eficacitate superioară, împreună cu doze mai puțin frecventă la un subiect cu o boală sau tulburare asociată cu C5.

Anticorpul conform invenției pot fi de lungime întreagă (de exemplu, un anticorp IgG1 sau IgG4) sau pot cuprinde doar o porțiune de legare la antigen (de exemplu, un fragment Fab, F(ab')₂ sau scFv) și pot fi modificat pentru a afecta funcționalitatea, de exemplu, pentru a crește persistența în gazdă sau pentru a elimina funcțiile efectoare reziduale (Reddy și colab., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933) în anumite realizări, anticorpul pot fi bispecfici.

În unele exemple de realizare, anticorpul sunt anticorpi monoclonali complet umani.

Rezumatul Învățăturilor Tehnice

Invenția este definită în revendicările independente. Alte aspecte și exemple de realizare preferate sunt definite în revendicările dependente. Orice aspecte, exemple de realizare și exemple ale prezentei dezvăluiri care nu intră în sfera revendicărilor anexate nu fac parte din invenție și sunt furnizate doar în scopuri ilustrative. în special, anticorpul conform invenției sunt definiți prin revendicări. Cu toate acestea, alți anticorpi anti-C5 exemplari sunt enumerați în Tabelele 1 și 2 de aici. Tabelul 1 prezintă identificatorii secvenței de aminoacizi ai regiunilor variabile ale lanțului greu (HCVR), regiunilor variabile ale lanțului ușor (LCVR), regiunile de determinare a complementarității lanțului greu (HCDR1, HCDR2 și HCDR3) și regiunile determinante a complementarității lanțului ușor (LCDR1, LCDR2). și LCDR3) de anticorpi anti-C5 exemplari. Tabelul 2 prezintă identificatorii secvenței de acid nucleic ai HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 și LCDR3 ai anticorpilor anti-C5 exemplificatori.

Exemplele de anticorpi anti-C5 enumerați în Tabelul 1 au o pereche de secvență de aminoacizi HCVR/LCVR selectată din grupul constând din SECV ID NR: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82 /90, 98/106, 98/114, 122/106, 98/130, 138/106, 146/106, 122/130, 146/114, 146/130, 138/130, 154/162, 170/178 , 186/194, 202/210, 218/226, 234/242, 250/258, 266/258, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330 și 334/348/3. În anumite cazuri, perechea de secvență de aminoacizi HCVR/LCVR este selectată dintre una dintre SECV ID NR: 50/58 (de exemplu, H4H12161P), 98/106 (anticorpul invenției, de exemplu, H4H12166P), 138/106 (de ex. , H4H12166P5) sau 202/210 (de exemplu, H4H12170P).

Invenția furnizează, de asemenea, un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia, cuprinzând un lanț greu și un lanț ușor, în care lanțul greu cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 353. Invenția furnizează, de asemenea, un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia, cuprinzând un lanț greu și un lanț ușor, în care lanțul ușor cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 354. Invenția furnizează, de asemenea, un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia, cuprinzând un lanț greu și un lanț ușor, în care lanțul greu cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 353 și lanțul ușor cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 354.

Anticorpul, sau fragmentele acestora de legare la antigen, dezvăluiți aici pot cuprinde un set de șase CDR-uri (adică HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) conținute în oricare dintre anticorpul anti-C5 exemplificați enumerați în Tabelul 1, cum ar fi ca setul de secvențe de aminoacizi HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 selectat din grupul constând din SECV ID NR: 52-54-56-60-62-64 (de exemplu, H4H12161P), 100-102-104- 108-110-112 (de exemplu, H4H12166P), 140-142-144-108-110-112 (de exemplu, H4H12166P5) și 204-206-208-212-214-216 (e.g. H4H12170P).

Anticorpul sau fragmentele acestora de legare la antigen, dezvăluiți aici pot cuprinde un set de șase CDR-uri (adică HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) conținute într-o pereche de secvențe de aminoacizi HCVR/LCVR așa cum este definită de oricare dintre anticorpi anti-C5 exemplari enumerați în tabelul 1. De exemplu, anticorpi sau fragmente ale acestora de legare la antigen, cuprinzând secvențele de aminoacizi HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 conținute într-o pereche de secvențe de

aminoacizi HCVR/LCVR selectată din grupul constând din SECV ID NR: 50 /58 (de exemplu, H4H12161P), 98/106 (anticorpul conform invenției, de exemplu, H4H12166P), 138/106 (de exemplu, H4H12166P5) sau 202/210 (de exemplu, H4H12170P) sunt dezvăluite. Metodele și tehnicile de identificare a CDR-urilor din secvențele de aminoacizi HCVR și LCVR sunt bine cunoscute în domeniu și pot fi utilizate pentru a identifica CDR-urile din secvențele de aminoacizi HCVR și/sau LCVR specificate descrise aici. Convențiile exemplificatoare care pot fi utilizate pentru a identifica limitele CDR-urilor includ, de exemplu, definiția Kabat, definiția Chothia și definiția AbM. În termeni generali, definiția Kabat se bazează pe variabilitatea secvenței, definiția Chothia se bazează pe locația regiunilor buclei structurale, iar definiția AbM este un compromis între abordările Kabat și Chothia. Vezi, de exemplu, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani și colab., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); și Martin și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Bazele de date publice sunt, de asemenea, disponibile pentru identificarea secvențelor CDR într-un anticorp.

Prezenta invenție include anticorpi anti-C5 având un model de glicozilare modificat. În unele exemple de realizare, modificarea pentru a elimina situsurile de glicozilare nedorite poate fi utilă sau un anticorp lipsit de o porțiune fucoză prezentă pe lanțul de oligozaharidă, de exemplu, pentru a crește funcția de citotoxicitate celulară dependentă de anticorpi (ADCC) (vezi Shield și colab. 2002) JBC 277:26733). În alte aplicații, se poate face modificarea galactozilării pentru a modifica citotoxicitatea dependentă de complement (CDC).

În anumite exemple de realizare, prezenta invenție furnizează anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen care prezintă legare dependentă de pH la C5. De exemplu, prezenta invenție include anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen care leagă C5 cu afinitate mai mare la pH neutru decât la pH acid (adică, legare redusă la pH acid).

În anumite exemple de realizare, prezenta invenție furnizează anticorpi și fragmente de legare la antigen care prezintă proprietăți farmacocinetice și farmacodinamice îmbunătățite, de exemplu, prezenta invenție furnizează anticorpi anti-C5 care au timp de înjumătățire în ser prelungit. În anumite cazuri, anticorpii anti-C5 au o concentrație serică mai mare de 10 pg/ml până în ziua 40 la șoarecii umanizați cu C5. În anumite cazuri, anticorpii anti-C5 blochează hemoliza CP- și AP până în ziua 35 la administrarea la șoareci umanizați C5.

Anticorpii și fragmentele de legare la antigen ale acestora descrise aici pot concura pentru legarea specifică la C5 cu un anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia cuprinzând CDR-urile unui HCVR și CDR-urile unui LCVR, în care HCVR și LCVR au fiecare o secvență de aminoacizi. selectate dintre secvențele HCVR și LCVR enumerate în Tabelul 1.

Anticorpii și fragmentele de legare la antigen ale acestora descrise aici pot concura încrucișat pentru legarea la C5 cu un anticorp de referință sau cu un fragment de legare la antigen al acestuia cuprinzând CDR-urile unui HCVR și CDR-urile unui LCVR, în care HCVR și LCVR au fiecare un amino. secvență de acid selectată dintre secvențele HCVR și LCVR enumerate în Tabelul 1.

Anticorpii și fragmentele de legare la antigen ale acestora descrise aici se pot lega la același epitop ca un anticorp de referință sau un fragment de legare la antigen al acestuia cuprinzând CDR-urile unui HCVR și CDR-urile unui LCVR, în care HCVR și LCVR au fiecare o secvență de aminoacizi. selectate dintre secvențele HCVR și LCVR enumerate în Tabelul 1.

Anticorpii anti-C5 și fragmentele acestora de legare la antigen descrise aici se pot lega la unul sau mai multe resturi de aminoacizi cuprinse în lanțul alfa și/sau lanțul beta al C5. Anticorpii și fragmentele de legare la antigen ale acestora descrise aici se pot lega la unul sau mai mulți aminoacizi din lanțul alfa al C5 și unul sau mai mulți aminoacizi din lanțul beta al C5. Anticorpii și fragmentele de legare la antigen ale acestora descrise aici se pot lega la unul sau mai mulți aminoacizi din lanțurile alfa și beta ale C5, în care anticorpii nu se leagă la domeniul anafilatoxină C5a. Anticorpii anti-C5 descriși aici pot interacționa cu unul sau mai mulți aminoacizi conținuți în C5 uman (SECV ID NR: 359). Anticorpii anti-C5 descriși aici pot interacționa cu unul sau mai mulți aminoacizi conținuți în C5 uman (SECV ID NR: 359), în care anticorpii nu se leagă la domeniul anafilatoxină C5a al C5. Anticorpii anti-C5 și fragmentele acestora de legare la antigen descrise aici pot interacționa cu o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din (a) aminoacizii 591 la 599 din SECV ID NR: 359; (b) aminoacizii 593 la 599 din SECV ID NR: 359; (c) aminoacizii 775 la 787 din SECV ID NR: 359; (d) aminoacizii 775 la 794 din SECV ID NR: 359; și (e) aminoacizii 779 la 787 din SECV ID NR: 359. Anticorpii anti-C5 și fragmentele acestora de legare la antigen descrise aici pot interacționa cu unul sau mai mulți aminoacizi conținuți în SECV ID NR: 359, de exemplu, anticorpi anti-C5 și fragmente ale acestora de legare la antigen care interacționează cu cel puțin 5 aminoacizi. , cel puțin 10 aminoacizi sau cel puțin 15 aminoacizi conținuți în SECV ID NR: 361. Anticorpii anti-C5 și fragmentele acestora de legare la antigen descrise aici pot interacționa cu unul sau mai mulți aminoacizi conținuți în SECV ID NR: 359, de exemplu, anticorpi anti-C5 și fragmente ale acestora

de legare la antigen care interacționează cu cel puțin 5 aminoacizi. conținut în SECV ID NR: 360. Anticorpul anti-C5 și fragmentele acestora de legare la antigen descrise aici pot interacționa cu cel puțin 5 aminoacizi conținuți în SECV ID NR: 360 și 361. Anticorpul anti-C5 și fragmentele acestora de legare la antigen descrise aici pot interacționa cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 360 (corespunzător aminoacizilor 591 până la 599 din SECV ID NR: 359) și cu secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 359 NR: 361 (corespunzător la aminoacizii 775 la 794 din SECV ID NR: 359).

Anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia descris aici se poate lega în mod specific la C5 într-o manieră agonistă, adică poate spori sau stimula legarea și/sau activitatea C5; sau anticorpul se poate lega în mod specific la C5 într-o manieră antagonistă, adică poate bloca legarea și/sau activitatea C5.

Anticorpul și fragmentele acestora de legare la antigen descrise aici pot bloca legarea C5 la convertaza C5. Anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia descris aici poate bloca legarea C5 la convertaza C5 se poate lega la același epitop pe C5 ca convertaza C5 sau se poate lega la un epitop diferit pe C5 ca convertaza C5. Anticorpul sau fragmentele acestora de legare la antigen descrise aici pot bloca legarea C5 la convertaza C5 de maimuță.

Anticorpul sau fragmentele de legare la antigen descrise aici pot fi bispecifice cuprinzând o primă specificitate de legare la un prim epitop al proteinei C5 și o a doua specificitate de legare la un al doilea epitop al proteinei C5 în care primul și cel de-al doilea epitop sunt distincte și nu se suprapun.

Anticorpul și fragmentele de legare la antigen descrise aici se pot lega la C5a cu un IC_{50} mai mic de 0,5 nM.

Anticorpul izolat sau fragmentul de legare la antigen al acestuia descris aici poate avea una sau mai multe dintre următoarele caracteristici: (a) este un anticorp monoclonal complet uman; (b) se leagă de C5 uman cu o constantă de disociere (K_D) mai mică de 0,9 nM la 25°C, măsurată într-un test de rezonanță cu plasmoni de suprafață; (c) se leagă de C5 uman cu un K_D mai mic de 0,3 nM la 37°C, măsurat într-un test de rezonanță cu plasmon de suprafață; (d) se leagă de maimuță C5 cu un K_D mai mic de 65 nM, măsurat într-un test de rezonanță a plasmonilor de suprafață; (e) se leagă la varianta umană C5 R885H (SECV ID NR: 356) cu un K_D mai mic de 0,5 nM, măsurat într-un test de rezonanță plasmonică de suprafață; (f) se leagă la varianta umană C5 R885C (SECV ID NR: 357) cu un K_D mai mic de 0,5 nM, măsurat într-un test de rezonanță plasmonică de suprafață; (g) blochează hemoliza căii clasice (CP) mediată de C5 umană cu mai mult de 95% și cu IC_{50} mai mică de 6 nM, măsurată într-un test de hemoliză CP; (h) blochează hemoliza căii alternative (AP) mediată de C5 umană cu mai mult de 70% și cu IC_{50} mai mică de 165 nM, măsurată într-un test de hemoliză AP; (i) inhibă hemoliza CP mediată de C5 de maimuță verde africană cu IC_{50} mai mică de 185 nM, măsurată într-un test de hemoliză CP; (j) inhibă hemoliza AP mediată de C5 de maimuță verde africană cu IC_{50} mai mică de 235 nM, măsurată într-un test de hemoliză AP; (k) inhibă hemoliza CP mediată de C5 de maimuță cynomolgus cu IC_{50} mai mică de 145 nM, măsurată într-un test de hemoliză CP; și (l) inhibă hemoliza AP mediată de C5 de maimuță cynomolgus cu IC_{50} mai mică de 30 nM, măsurată într-un test de hemoliză AP.

Anticorpul monoclonal recombinant izolat anti-C5 sau fragmentul de legare la antigen al acestuia descris aici poate avea una sau mai multe dintre următoarele caracteristici: (a) cuprinde un set de șase CDR-uri cuprinzând secvențele de aminoacizi ale SECV ID NR: 100-102-104 -108-110-112; (b) se leagă la C5 uman cu o constantă de disociere (K_D) mai mică de 0,2 nM la 25°C, măsurată într-un test de rezonanță cu plasmoni de suprafață; (c) se leagă la C5 uman cu un K_D mai mic de 0,3 nM la 37°C, așa cum se măsoară într-un test de rezonanță plasmonică de suprafață; (d) se leagă la o variantă umană C5 (R885H) cu un K_D mai mic de 0,4 nM la 37°C, măsurat într-un test de rezonanță plasmonică de suprafață; (e) inhibă hemoliza mediată de calea clasică (CP) a serului uman cu un IC_{50} mai mic de 3 nM; (f) inhibă hemoliza mediată de calea alternativă (AP) a serului uman cu un IC_{50} mai mic de 27 nM; (g) inhibă hemoliza mediată de CP a serului de maimuță cu un IC_{50} mai mic de 21 nM; (h) inhibă hemoliza mediată de AP a serului de maimuță cu un IC_{50} mai mic de 10 nM; (i) are un timp de înjumătățire plasmatică ($t_{1/2}$) mai mare de 10 zile la șoarecii umanizați cu C5; (j) are o concentrație serică mai mare de 10 pg/mL până în ziua 40 la administrarea la șoareci umanizați C5; (k) blochează hemoliza mediată de CP până în ziua 50 la șoarecii umanizați cu C5; și (l) se leagă la unul sau mai mulți aminoacizi cuprinși în lanțul alfa și/sau lanțul beta din SECV ID NR: 359, în care anticorpul nu se leagă la domeniul anafilatoxină C5a al C5.

Într-un al doilea aspect, sunt descrise aici molecule de acid nucleic care codifică anticorpi anti-C5 sau porțiuni ale acestora. De exemplu, moleculele de acid nucleic descrise aici pot codifica oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR enumerate în Tabelul 1; în anumite cazuri, molecula de acid nucleic cuprinde o secvență de polinucleotidă selectată dintre oricare dintre secvențele de acid nucleic HCVR enumerate în tabelul 2, sau o secvență substanțial similară a acestora având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% % identitate de secvență față de acesta.

Moleculele de acid nucleic descrise aici pot codifica oricare dintre secvențele de aminoacizi LCVR enumerate în Tabelul 1; în anumite cazuri, molecula de acid nucleic cuprinde o secvență de polinucleotidă

selectată dintre oricare dintre secvențele de acid nucleic LCVR enumerate în tabelul 2, sau o secvență substanțial similară a acesteia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% % identitate de secvență față de acesta.

Moleculele de acid nucleic descrise aici pot codifica atât un HCVR, cât și un LCVR, în care HCVR cuprinde o secvență de aminoacizi a oricăreia dintre secvențele de aminoacizi HCVR enumerate în Tabelul 1 și în care LCVR cuprinde o secvență de aminoacizi a oricăruia dintre aminoacizii LCVR. secvențe de acid enumerate în Tabelul 1. În anumite cazuri, molecula de acid nucleic cuprinde o secvență de polinucleotidă selectată dintre oricare dintre secvențele de acid nucleic HCVR enumerate în Tabelul 2, sau o secvență substanțial similară a acesteia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate de secvență de 99% cu aceasta și o secvență de polinucleotidă selectată dintre oricare dintre secvențele de acid nucleic LCVR enumerate în Tabelul 1, sau o secvență substanțial similară a acesteia având cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitatea secvenței acestuia. În anumite cazuri, molecula de acid nucleic codifică un HCVR și LCVR, în care HCVR și LCVR sunt ambele derivate din același anticorp anti-C5 enumerat în Tabelul 1. Invenția furnizează o moleculă de polinucleotidă izolată cuprinzând o secvență de nucleotide care codifică o HCVR a unui anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia conform invenției și o secvență de nucleotide care codifică un LCVR a unui anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia conform invenției.

Într-un aspect înrudit, prezenta invenție furnizează vectori de expresie recombinanți cuprinzând molecula de polinucleotidă a prezentei invenții, așa cum este definit în revendicări. Vectorul este capabil să exprime o polipeptidă care cuprinde regiunea variabilă a lanțului greu sau ușor a anticorpului anti-C5. De asemenea, în scopul prezentei invenții sunt incluse celule gazdă care exprimă vectorii invenției.

Într-un al treilea aspect, invenția furnizează o compoziție farmaceutică care cuprinde anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia din prezenta invenție, așa cum este definit în revendicări, și un purtător sau diluant acceptabil farmaceutic. În unele cazuri, compoziția poate fi o combinație a anticorpului anti-C5 conform invenției și un al doilea agent terapeutic. Într-un caz, al doilea agent terapeutic poate fi orice agent care este combinat în mod avantajos cu un anticorp anti-C5. Exemple de agenți care pot fi combinați în mod avantajos cu un anticorp anti-C5 includ, fără limitare, alți agenți care leagă și/sau inhibă activitatea C5 (inclusiv alți anticorpi sau fragmente ale acestora de legare la antigen etc.) și/sau agenți care nu leagă direct leagă C5, dar totuși tratează sau ameliorează cel puțin un simptom sau indiciu al unei boli sau tulburări asociate cu C5. Terapii combinate suplimentare și co-formulări care implică anticorpii anti-C5 din prezenta invenție sunt dezvăluite în altă parte aici.

Orice referire în descriere la metode de tratament se referă la compuși, compoziții farmaceutice și medicamente din prezenta invenție pentru utilizare într-o metodă de tratare a corpului uman (sau animal) prin terapie.

În anumite exemple de realizare, invenția furnizează anticorpul anti-C5 sau fragmentul de legare la antigen al acestuia din invenție pentru utilizare în metode de prevenire, tratare sau ameliorare a cel puțin unui simptom al sindromului hemolitic uremic atipic (SHUa), metoda cuprinzând administrarea unui tratament terapeutic. cantitate eficientă dintr-un anticorp anti-C5 sau fragment al acestuia de legare la antigen conform invenției la un subiect care are nevoie de acesta. În unele exemple de realizare, prezenta invenție furnizează anticorpul anti-C5 sau fragmentul acestuia de legare la antigen al invenției pentru utilizare în metode de ameliorare sau reducere a severității a cel puțin unui simptom sau indicație de hemoglobinurie nocturnă paroxistică (PNH) la un subiect prin administrarea unui anticorp anti-C5 conform invenției. În unele exemple de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia poate fi administrat profilactic sau terapeutic unui subiect care are sau riscă să aibă o boală sau tulburare asociată cu C5. în anumite variante de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia, conform invenției, este administrat în combinație cu un al doilea agent terapeutic subiectului care are nevoie de acesta. Al doilea agent terapeutic poate fi selectat din grupul constând dintr-un medicament antiinflamator (cum ar fi corticosteroizi și medicamente antiinflamatoare nesteroidiene), un anticorp diferit la proteina C5, un supliment alimentar cum ar fi antioxidanți și orice alt medicament sau terapie cunoscută în domeniu. în anumite exemple de realizare, al doilea agent terapeutic poate fi un agent care ajută la contracararea sau reducerea oricăror efecte secundare posibile asociate cu un anticorp sau cu un fragment de legare la antigen al acestuia din invenție, dacă ar trebui să apară un astfel de efect (e) secundar. Anticorpul sau fragmentul acestuia poate fi administrat subcutanat, intravenos, intradermic, intraperitoneal, oral sau intramuscular. Anticorpul sau fragmentul acestuia poate fi administrat la o doză de aproximativ 0,1 mg/kg greutate corporală până la aproximativ 100 mg/kg greutate corporală a subiectului. în anumite variante de realizare, un anticorp al prezentei invenții poate fi administrat la una sau mai multe doze cuprinzând între 50 mg și 600 mg.

Alte exemple de realizare vor deveni evidente dintr-o revizuire a descrierii detaliate care urmează.

SCURTĂ DESCRIERE A FIGURILOR

Figura 1 prezintă inhibarea nivelurilor C5a de către anticorpul anti-C5 H4H12166P într-o manieră dependentă de doză, așa cum s-a determinat prin ELISA (descrie în Exemplul 9 de aici).

Figura 2 prezintă concentrația totală în ser în funcție de timp după o singură injecție intravenoasă de 15 mg/kg de H4H12166P, H4H12161P sau Comparatorul 2 la masculii de maimuță cynomolgus (descrie în Exemplul 10 de aici). Profilurile concentrație-timp au fost reprezentate grafic prin rezultatul primei post-doză sub limita de cuantificare (BLQ), dacă este cazul, care a fost imputat ca LLOQ/2. Fiecare punct de date reprezintă Media ($\pm$ SD) ($n = 4$ animale/grup); concentrațiile considerate a fi afectate de ADA au fost excluse de la 1 animal din grupul H4H12166P și 1 animal din grupul H4H12161P începând cu ziua 36 și, respectiv, ziua 29. LLOQ = Limita inferioară de cuantificare.

Figura 3 prezintă procentul de hemoliză în raport cu timpul în testele *ex vivo* ale celulelor roșii din sânge (A) Calea clasică și (B) Calea alternativă după o singură injecție intravenoasă de H4H12166P, H4H12161P sau Comparator 2 la masculii cynomolgus. % hemoliza, calculată ca raport dintre liza experimentală vs. maximă cu % liza de fond scăzută din ambele valori, este legată de cantitatea de C5 inhibată de anticorpul particular anti-C5 prezent în ser la un moment dat. Fiecare punct de date reprezintă Media ($\pm$ SD).

Figura 4 prezintă concentrația totală în ser în funcție de profilurile de timp ale anticorpilor anti-C5 selectați la șoareci umanizați pentru C5 (descrie în Exemplul 11 de aici). Șoarecilor C5 umanizați li s-a administrat o singură doză subcutanată de 15 mg/kg de H4H12166P, Comparator 1 sau Comparator 2. Fiecare punct de date reprezintă media $\pm$ s.e.m. ($n = 4-5$ fiecare). Concentrațiile de anticorpi din ser au fost monitorizate la 1, 10, 20, 30 și 40 de zile după injectare folosind un ELISA sandwich.

Figura 5 prezintă procentul de hemoliză în funcție de timp într-un test de hemoliză a căii clasice complementare *ex vivo* a anticorpilor anti-C5 selectați la șoareci umanizați pentru C5. Șoarecilor C5 umanizați li s-a administrat o singură doză subcutanată de 15 mg/kg de H4H12166P, Comparator 1 sau Comparator 2. Fiecare punct de date reprezintă Media $\pm$ s.e.m. ($n = 4-5$ fiecare). Procentul de hemoliză în ser a fost monitorizat la predozare, la 10, 20, 30, 40 și 50 de zile după injectare. % hemoliza, calculată ca raport dintre liza experimentală vs. maximă cu % liza de fond scăzută din ambele valori, este legată de cantitatea de C5 inhibată de anticorpul particular anti-C5 prezent în ser la un moment dat.

Figura 6 prezintă concentrația totală în ser în funcție de profilurile de timp ale anticorpilor anti-C5 selectați la șoareci umanizați pentru C5 (descrie în Exemplul 11 de aici). Șoarecilor li s-a administrat o singură doză subcutanată de 15 mg/kg de H4H12166P, H4H12161P, Comparator 1 sau martor izotip IgG4^P. Fiecare punct de date reprezintă media $\pm$ s.e.m. ($n = 5$ fiecare). Nivelurile de anticorpi din ser au fost monitorizate la 6 ore, 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 21, 30, 45 și 59 de zile după injectare folosind un ELISA sandwich.

Figura 7 este un grafic care prezintă scorurile tomografiei cu coerență optică (OCT) la șoarecii tratați cu control izotip sau cu anticorp anti-C5 M1M17628N la 10 mg/kg sau 50 mg/kg (descrie în Exemplul 14 de aici). **** $p < 0,0001$, tratament ANOVA bidirecțional cu anticorp anti-C5 la 50 mg/kg față de niciun tratament sau tratament cu control izotip.

Figura 8 prezintă inhibarea hemolizei căii clasice de către anticorpul anti-C5 M1M17628N în absența C3 (A); și în prezența a 80 pg/mL de C3 uman (B) (descrie în Exemplul 14 de aici).

Figura 9 prezintă numărul de grupe de celule la șoareci umanizați C5 tratați cu control izotip sau cu anticorp C5 anti-uman H4H12170P la 10 mg/kg sau 50 mg/kg (descrie în Exemplul 15 de aici). $n = 8-12$ ochi pentru fiecare grup.

Figura 10 este un grafic care arată scorurile OCT la șoarecii umanizați C5 tratați cu control izotip sau cu anticorp C5 anti-uman H4H12170P la 10 mg/kg sau 50 mg/kg (descrie în Exemplul 15 de aici). $n = 8-12$ ochi pentru fiecare grup.

Figura 11 este un grafic care arată scorurile OCT la șoarecii umanizați C5 tratați cu control izotip, anticorp C5 anti-uman H4H12166P la 3 mg/kg sau 10 mg/kg sau Comparatorul 2 la 10 mg/kg. $n = 6-12$ ochi pentru fiecare grup (descrie în Exemplul 15 de aici).

Figura 12 prezintă numărul de grupe de celule la șoareci umanizați C5 tratați cu control izotip, anticorp C5 anti-uman H4H12166P la 3 mg/kg sau 10 mg/kg sau Comparatorul 2 la 10 mg/kg. $n = 6-12$ ochi pentru fiecare grup (descrie în Exemplul 15 de aici).

Figura 13 este o curbă de supraviețuire a șoarecilor NZBWF1 tratați cu control izotip sau cu anticorpi anti-C5 M1M17628N sau M1M17627N (descrie în Exemplul 17 de aici).

Figura 14 prezintă nivelurile de (A) albumină urinară și (B) albumină urinară normalizate la creatinina urinară la șoareci NZBWF1 tratați cu control izotip sau cu anticorpi anti-C5 M1M17628N sau M1M17627N (descrie în Exemplul 17 de aici).

Figura 15 prezintă nivelurile de azot ureic din sânge la șoarecii NZBWF1 tratați cu control izotip sau cu anticorpi anti-C5 M1M17628N sau M1M17627N (descrie în Exemplul 17 de aici).

Figura 16 este un grafic care arată inhibarea citotoxicității dependente de anticorpi a astrocitelor de către anticorpii anti-C5 H4H12166P, H4H12170P, Comparatorul 1 și Comparatorul 2, așa cum este descris în Exemplul 18.

DESCRIERE DETALIATA

Înainte ca prezentele metode să fie descrise, trebuie să se înțeleagă că această invenție nu este limitată la anumite metode și condiții experimentale descrise, deoarece astfel de metode și condiții pot varia. De asemenea, trebuie înțeles că terminologia utilizată aici are doar scopul de a descrie exemple de realizare particulare și nu se intenționează să fie limitativă, deoarece scopul prezentei invenții va fi limitat doar de revendicările anexate.

Dacă nu este definit altfel, toți termenii tehnici și științifici utilizați aici au aceeași semnificație pe care o înțeleg în mod obișnuit de către o persoană cu calificare obișnuită în domeniul căruia îi aparține această invenție. Deși orice metode și materiale similare sau echivalente cu cele descrise aici pot fi utilizate în practica sau testarea prezentei invenții, metodele și materialele preferate sunt acum descrise.

Definiții

Termenul "C5", numit și "componenta complementului 5" sau "factorul complementului 5" se referă la proteina serică a cascadei complementului.

Proteina C5 este o proteină cu 1676 de aminoacizi care cuprinde două lanțuri, alfa și beta. Proteina reprezintă punctul de convergență pentru trei căi de activare a complementului: calea clasică, calea alternativă și calea lectinei de legare a manozei. Secvența de aminoacizi a proteinei C5 de lungime completă este exemplificată de secvența de aminoacizi furnizată în GenBank ca număr de acces NP_001726.2 (SECV ID NR: 355). Termenul "C5" include proteina C5 recombinantă sau un fragment al acesteia. Termenul include, de asemenea, proteina C5 sau un fragment al acesteia cuplat, de exemplu, cu etichetă de histidină, Fc de șoarece sau uman, sau o secvență semnal cum ar fi ROR1. De exemplu, termenul include secvențe exemplificate prin secvența prezentată în SECV ID NR: 356 sau 357, cuprinzând o etichetă de histidină la C-terminal, cuplată la resturile de aminoacizi 19 - 1676 ale proteinei C5 de lungime întreagă. Termenul include, de asemenea, variante de proteină care cuprind o etichetă de histidină la C-terminal, cuplată la resturile de aminoacizi 19 - 1676 ale proteinei C5 de lungime completă cu o modificare R885H sau o modificare R885C.

Termenul "anticorp", așa cum este utilizat aici, este destinat să se refere la molecule de imunoglobulină compuse din patru lanțuri polipeptidice, două lanțuri grele (H) și două lanțuri ușoare (L) interconectate prin legături disulfură (adică, "molecule de anticorp complet"), precum și multimerii acestora (de ex. IgM) sau fragmente ale acestora de legare la antigen. Fiecare lanț greu este compus dintr-o regiune variabilă a lanțului greu ("HCVR" sau "V_H") și o regiune constantă a lanțului greu (cuprinsă din domeniile C_{H1}, C_{H2} și C_{H3}). Fiecare lanț ușor este compus dintr-o regiune variabilă a lanțului ușor ("LCVR sau "V_L") și o regiune constantă a lanțului ușor (C_L). Regiunile V_H și V_L pot fi subdivizate în continuare în regiuni de hipervariabilitate, numite regiuni de determinare a complementarității (CDR), intercalate cu regiuni care sunt mai conservate, numite regiuni cadru (FR). Fiecare V_H și V_L este compus din trei CDR-uri și patru FR-uri, aranjate de la amino-terminal la carboxi-terminal în următoarea ordine: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. FR-urile anticorpului (sau fragmentul de legare la antigen al acestuia) pot fi identice cu secvențele liniei germinale umane sau pot fi modificate în mod natural sau artificial. O secvență consens de aminoacizi poate fi definită pe baza unei analize alăturate a două sau mai multe CDR-uri.

Este de asemenea posibilă înlocuirea unuia sau mai multor reziduuri CDR sau omiterea unuia sau mai multor CDR. Au fost descriși anticorpi în literatura științifică în care unul sau două CDR-uri pot fi renunțate pentru legare. Padlan și colab. (1995 FASEB J. 9:133-139) a analizat regiunile de contact dintre anticorpi și antigenele lor, pe baza structurilor cristaline publicate, și a concluzionat că doar aproximativ o cincime până la o treime din reziduurile CDR contactează efectiv antigenul. Padlan a găsit, de asemenea, mulți anticorpi în care unul sau două CDR nu au avut aminoacizi în contact cu un antigen (vezi, de asemenea, Vajdos și colab. 2002 J Mol Biol 320:415-428).

Reziduurile CDR care nu intră în contact cu antigenul pot fi identificate pe baza studiilor anterioare (de exemplu, resturile H60-H65 din CDRH2 nu sunt adesea necesare), din regiunile CDR-urilor Kabat aflate în afara CDR-urilor Chothia, prin modelare moleculară și/sau empiric. Dacă un CDR sau reziduuri ale acestuia este omis, acesta este de obicei substituit cu un aminoacid care ocupă poziția corespunzătoare într-o altă secvență de anticorp uman sau un consens al unor astfel de secvențe. Pozițiile pentru substituție în cadrul CDR-urilor și aminoacizii de substituit pot fi, de asemenea, selectate empiric. Substituțiile empirice pot fi substituții conservative sau neconservative.

Anticorpii monoclonali anti-C5 complet umani dezvoltati aici pot cuprinde una sau mai multe substituții de aminoacizi, inserții și/sau deleții în cadrul și/sau regiunile CDR ale domeniilor variabile ale lanțului greu și ușor în comparație cu secvențele germinale corespunzătoare. Astfel de mutații pot fi constatate cu ușurință prin compararea secvențelor de aminoacizi dezvoltate aici cu secvențele liniei

germinale disponibile, de exemplu, din bazele de date publice de secvențe de anticorpi. Sunt descriși aici anticorpi și fragmente de legare la antigen ale acestora, care sunt derivate din oricare dintre secvențele de aminoacizi descrise aici, în care unul sau mai mulți aminoacizi din unul sau mai multe regiuni cadru și/sau CDR sunt mutați la restul(ele) corespunzător(e) a secvenței de linie germinală din care a derivat anticorpul, sau la restul(ele) corespunzător(i) al altei secvențe de linie germinală umană, sau la o substituție conservativă de aminoacizi a restului(ilor) de linie germinativă (asemenea modificări ale secvenței sunt denumite aici în mod colectiv ca „mutații ale liniei germinale”). O persoană cu calificare obișnuită în domeniu, începând cu secvențele de regiune variabilă a lanțului greu și ușor descrise aici, poate produce cu ușurință numeroși anticorpi și fragmente de legare la antigen care cuprind una sau mai multe mutații individuale ale liniei germinale sau combinații ale acestora. În anumite variante de realizare, toate resturile cadru și/sau CDR din domeniile V_H și/sau V_L sunt mutate înapoi la resturile găsite în secvența liniei germinale originale din care a fost derivat anticorpul. În alte exemple de realizare, numai anumite reziduuri sunt mutate înapoi la secvența originală a liniei germinale, de exemplu, numai resturile mutante găsite în primii 8 aminoacizi ai FR1 sau în ultimii 8 aminoacizi ai FR4, sau numai resturile mutante găsite în CDR1, CDR2 sau CDR3. În alte exemple de realizare, unul sau mai multe dintre resturile cadru și/sau CDR sunt mutate la restul (reziduurile) corespunzătoare ale unei secvențe de linie germinală diferită (adică, o secvență de linie germinală care este diferită de secvența de linie germinală din care a fost anticorpul). derivate inițial). Mai mult, anticorpii descriși aici pot conține orice combinație de două sau mai multe mutații ale liniei germinale în cadrul și/sau regiunilor CDR, de exemplu, în care anumite resturi individuale sunt mutate la restul corespunzător al unei anumite secvențe de linie germinală, în timp ce anumite alte resturi care diferă de secvența germinală originală sunt menținute sau sunt mutate la reziduul corespunzător al unei secvențe de linie germinală diferită. Odată obținute, anticorpii și fragmentele de legare la antigen care conțin una sau mai multe mutații ale liniei germinale pot fi testate cu ușurință pentru una sau mai multe proprietăți dorite, cum ar fi specificitatea de legare îmbunătățită, afinitatea de legare crescută, proprietățile biologice antagoniste sau agoniste îmbunătățite sau îmbunătățite (după caz). fi), imunogenitate redusă etc.

Anticorpii monoclonali anti-C5 complet umani descriși aici pot cuprinde variante ale oricăreia dintre secvențele de aminoacizi HCVR, LCVR și/sau CDR dezvăluite aici având una sau mai multe substituții conservatoare. De exemplu, anticorpi anti-C5 având secvențe de aminoacizi HCVR, LCVR și/sau CDR cu, de exemplu, 10 sau mai puține, 8 sau mai puține, 6 sau mai puține, 4 sau mai puține, etc. substituții conservatoare de aminoacizi în raport cu oricare dintre Secvențe de aminoacizi HCVR, LCVR și/sau CDR descrise aici.

Termenul "anticorp uman", așa cum este utilizat aici, este destinat să includă anticorpi având regiuni variabile și constante derivate din secvențele de imunoglobuline ale liniei germinale umane. mAbs umani conform invenției pot include resturi de aminoacizi necodificate de secvențe de imunoglobuline ale liniei germinale umane (de exemplu, mutații introduse prin mutagenезă aleatorie sau specifică locului *in vitro* sau prin mutație somatică *in vivo*), de exemplu în CDR-uri și în special CDR3. Cu toate acestea, termenul "anticorp uman", așa cum este utilizat aici, nu este destinat să includă mAb-uri în care secvențele CDR derivate din linia germinativă a unei alte specii de mamifere (de exemplu, șoarece), au fost grefate pe secvențe FR umane. Termenul include anticorpi produși recombinant într-un mamifer non-uman sau în celulele unui mamifer non-uman. Termenul nu este destinat să includă anticorpi izolați de la sau generați la un subiect uman.

Termenul "recombinant", așa cum este utilizat aici, se referă la anticorpi sau fragmente de legare la antigen ale acestora din invenție creați, exprimați, izolați sau obținuți prin tehnologii sau metode cunoscute în domeniu ca tehnologie ADN recombinant care includ, de exemplu, splicing ADN și transgenic. expresie. Termenul se referă la anticorpi exprimați într-un mamifer non-uman (inclusiv mamifere transgenice non-umane, de exemplu, șoareci transgenici) sau la un sistem de expresie celular (de exemplu, celule CHO) sau izolați dintr-o bibliotecă de anticorpi umani combinatori recombinanți.

Termenul "se leagă în mod specific" sau "se leagă în mod specific la", sau altele asemenea, înseamnă că un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia formează un complex cu un antigen care este relativ stabil în condiții fiziologice. Legarea specifică poate fi caracterizată printr-o constantă de disociere de echilibru de cel puțin aproximativ 1×10^{-8} M sau mai puțin (de exemplu, un K_D mai mic denotă o legare mai strânsă). Metodele pentru a determina dacă două molecule se leagă în mod specific sunt bine cunoscute în domeniu și includ, de exemplu, dializa de echilibru, rezonanța plasmonilor de suprafață și altele asemenea. Așa cum este descris aici, anticorpii au fost identificați prin rezonanța plasmonilor de suprafață, de exemplu, BIACORE™, care se leagă în mod specific la C5. Mai mult, anticorpii multispecifici care se leagă la un domeniu în C5 și unul sau mai mulți antigeni suplimentari sau un bispecific care se leagă la două regiuni diferite ale C5 sunt totuși considerați anticorpi care "se leagă în mod specific", așa cum este utilizat aici.

Termenul „anticorp de mare afinitate” se referă la acei mAb care au o afinitate de legare la C5, exprimată ca K_D , de cel puțin 10^{-8} M; preferabil 10^{-9} M; mai preferabil 10^{-10} M, chiar mai preferabil 10^{-11} M, chiar mai preferabil 10^{-12} M, măsurat prin rezonanța plasmonilor de suprafață, de exemplu, BIACORE™ sau ELISA de afinitate la soluție.

Prin termenul „viteză lentă”, „Koff” sau „kd” se înțelege un anticorp care se disociază de C5, cu o constantă de viteză de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ sau mai puțin, de preferință $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ sau mai puțin, așa cum este determinat de plasmonul de suprafață rezonanță, de exemplu, BIACORE™.

Termenii „porțiune de legare la antigen” a unui anticorp, „fragment de legare la antigen” a unui anticorp și altele asemenea, așa cum sunt utilizate aici, includ orice polipeptidă sau glicoproteină care se leagă în mod specific la o polipeptidă naturală, obținută enzimatic, sintetică sau modificată genetic antigenul pentru a forma un complex. Termenii "fragment de legare la antigen" a unui anticorp, sau "fragment de anticorp", așa cum sunt utilizați aici, se referă la unul sau mai multe fragmente ale unui anticorp care păstrează capacitatea de a se lega la proteina C5.

În exemple de realizare specifice, anticorpii sau fragmentele de anticorp ale invenției pot fi conjugate la un fragment, cum ar fi un ligand sau un fragment terapeutic ("imunconjugat"), un al doilea anticorp anti-C5 sau orice alt fragment terapeutic util pentru tratarea unei boli asociate cu C5. sau tulburare.

Un „anticorp izolat”, așa cum este utilizat aici, este destinat să se refere la un anticorp care este în mod substanțial lipsit de alți anticorpi (Abs) având specificități antigenice diferite (de exemplu, un anticorp izolat care leagă în mod specific C5, sau un fragment al acestuia, este în mod substanțial liber de Abs care se leagă în mod specific de antigene altele decât C5.

Un „anticorp de blocare” sau un „anticorp de neutralizare”, așa cum este utilizat aici (sau un „anticorp care neutralizează activitatea C5” sau „anticorp antagonist”), este destinat să se refere la un anticorp a cărui legare la C5 are ca rezultat inhibarea a cel puțin unei activități biologice a C5. De exemplu, un anticorp al invenției poate preveni sau bloca hemoliza mediată de complement prin cale clasică sau cale alternativă.

Termenul „rezonanță plasmonică de suprafață”, așa cum este utilizat aici, se referă la un fenomen optic care permite analiza în timp real a interacțiunilor biomoleculare prin detectarea modificărilor concentrațiilor de proteine într-o matrice biosenzor, de exemplu folosind sistemul BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suedia și Piscataway, N.J.).

Termenul " K_D ", așa cum este utilizat aici, este destinat să se refere la constanta de disociere de echilibru a unei anumite interacțiuni anticorp-antigen.

Termenul "epitop" se referă la un determinant antigenic care interacționează cu un situs specific de legare a antigenului în regiunea variabilă a unei molecule de anticorp cunoscută ca paratop. Un singur antigen poate avea mai mult de un epitop. Astfel, anticorpi diferiți se pot lega la diferite zone ale unui antigen și pot avea efecte biologice diferite. Termenul "epitop" se referă, de asemenea, la un situs al unui antigen la care răspund celulele B și/sau T. De asemenea, se referă la o regiune a unui antigen care este legată de un anticorp. Epitopii pot fi definiți ca structurali sau funcționali.

Epitopii funcționali sunt în general un subset al epitopilor structurali și au acele reziduuri care contribuie direct la afinitatea interacțiunii. Epitopii pot fi, de asemenea, conformaționali, adică compuși din aminoacizi neliniari. În anumite realizări, epitopii pot include determinanți care sunt grupări de suprafață active din punct de vedere chimic de molecule, cum ar fi aminoacizi, lanțuri laterale de zahăr, grupări fosforil sau grupări sulfonil și, în anumite realizări, pot avea caracteristici structurale tridimensionale specifice și/sau caracteristici specifice de sarcină.

Termenul "concurență încrucișată", așa cum este utilizat aici, înseamnă un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia se leagă la un antigen și inhibă sau blochează legarea altui anticorp sau fragment al acestuia de legare la antigen. Termenul include, de asemenea, competiția între doi anticorpi în ambele orientări, adică un prim anticorp care se leagă și blochează legarea celui de-al doilea anticorp și invers. În anumite variante de realizare, primul anticorp și al doilea anticorp se pot lega la același epitop. Alternativ, primul și al doilea anticorp se pot lega la epitopi diferiți, dar suprapusi, astfel încât legarea unuia inhibă sau blochează legarea celui de-al doilea anticorp, de exemplu, prin obstacol steric. Competiția încrucișată între anticorpi poate fi măsurată prin metode cunoscute în domeniu, de exemplu, printr-un test de interferometrie cu bio-strat în timp real, fără etichete. Competiția încrucișată între doi anticorpi poate fi exprimată ca legarea celui de-al doilea anticorp care este mai mică decât semnalul de fundal datorită autolegăturii (în care primul și al doilea anticorp sunt același anticorp). Competiția încrucișată între 2 anticorpi poate fi exprimată, de exemplu, ca % de legare a celui de-al doilea anticorp care este mai mică decât autolegarea de fond de bază (în care primul și al doilea anticorp sunt același anticorp).

Termenul „identitate substanțială” sau „substanțial identic”, atunci când se referă la un acid nucleic sau fragment al acestuia, indică faptul că, atunci când este aliniat optim cu inserții sau deleții de nucleotide adecvate cu un alt acid nucleic (sau catena sa complementară), există identitate de secvență de nucleotide.

în cel puțin aproximativ 90% și mai preferabil cel puțin aproximativ 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% din baze nucleotidice, măsurate prin orice algoritm binecunoscut de identitate de secvență, cum ar fi FASTA, BLAST sau GAP, după cum se discută mai jos. O moleculă de acid nucleic având identitate substanțială cu o moleculă de acid nucleic de referință poate, în anumite cazuri, să codifice o polipeptidă având aceeași secvență de aminoacizi sau substanțial similară cu polipeptida codificată de molecula de acid nucleic de referință.

Așa cum se aplică polipeptidelor, termenul „asemănare substanțială” sau „substanțial asemănător” înseamnă că două secvențe de peptide, atunci când sunt aliniate optim, cum ar fi prin programele GAP sau BESTFIT, folosind ponderi implicite ale intervalului, împărtășesc cel puțin 90% identitate de secvență, chiar mai preferabil cel puțin 95%, 98% sau 99% identitate de secvență. De preferință, pozițiile resturilor, care nu sunt identice, diferă prin substituții conservatoare de aminoacizi. O „substituție conservatoare de aminoacid” este una în care un rest de aminoacid este substituit cu un alt rest de aminoacid având o catenă laterală (grupare R) cu proprietăți chimice similare (de exemplu, sarcină sau hidrofobicitate). În general, o substituție conservatoare a aminoacizilor nu va schimba substanțial proprietățile funcționale ale unei proteine. În cazurile în care două sau mai multe secvențe de aminoacizi diferă una de cealaltă prin substituții conservatoare, procentul sau gradul de similaritate poate fi ajustat în sus pentru a corecta natura conservatoare a substituției. Mijloacele pentru realizarea acestei ajustări sunt bine cunoscute specialiștilor în domeniu.

Vezi, de exemplu, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Exemple de grupe de aminoacizi care au catene laterale cu proprietăți chimice similare includ: 1) catene laterale alifatic: glicină, alanină, valină, leucină și izoleucină; 2) catene laterale alifatic-hidroxil: serină și treonină; 3) lanțuri laterale care conțin amidă: asparagină și glutamina; 4) lanțuri laterale aromatice: fenilalanină, tirozină și triptofan; 5) lanțuri laterale de bază: lizină, arginină și histidină; 6) lanțuri laterale acide: aspartat și glutamat și 7) lanțuri laterale care conțin sulf: cisteină și metionină. Grupările de substituție de aminoacizi conservatoare preferate sunt: valină-leucină-izoleucină, fenilalanină-tirozină, lizină-arginină, alanină-valină, glutamat-aspartat și asparagină-glutamina. Alternativ, o înlocuire conservatoare este orice modificare care are o valoare pozitivă în matricea log-probabilității PAM250 dezvăluită în Gonnet și colab. (1992) *Știința* 256: 1443-45. O înlocuire „moderat conservatoare” este orice modificare care are o valoare nenegativă în matricea log-probabilității PAM250.

Asemănarea secvenței pentru polipeptide este de obicei măsurată folosind software-ul de analiză a secvenței. Software-ul de analiză a proteinelor potrivește secvențe similare folosind măsuri de similitudine atribuite diferitelor substituții, deleții și alte modificări, inclusiv substituții conservatoare de aminoacizi. De exemplu, software-ul GCG conține programe precum GAP și BESTFIT care pot fi utilizate cu parametrii implicați pentru a determina omologia secvenței sau identitatea secvenței între polipeptide strâns legate, cum ar fi polipeptide omoloage din diferite specii de organisme sau între o proteină de tip sălbatic și o muteină a acesteia. Vezi, de exemplu, GCG Versiunea 6.1. Secvențele de polipeptide pot fi, de asemenea, comparate folosind FASTA cu parametrii implicați sau recomandați; un program în GCG versiunea 6.1. FASTA (de exemplu, FASTA2 și FASTA3) furnizează alinamente și identitate de secvență procentuală a regiunilor cu cea mai bună suprapunere între secvențele de interogare și de căutare (Pearson (2000) supra).

Un alt algoritm preferat atunci când se compară o secvență cu o bază de date care conține un număr mare de secvențe din diferite organisme este programul de calculator BLAST, în special BLASTP sau TBLASTN, folosind parametrii implicați. A se vedea, de exemplu, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 și (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Prin expresia "cantitate eficientă terapeutic" se înțelege o cantitate care produce efectul dorit pentru care este administrată. Cantitatea exactă va depinde de scopul tratamentului și va fi verificată de către un specialist în domeniu utilizând tehnici cunoscute (vezi, de exemplu, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Așa cum este utilizat aici, termenul "subiect" se referă la un animal, de preferință un mamifer, mai preferabil un om, care are nevoie de ameliorarea, prevenirea și/sau tratamentul unei boli sau tulburări asociate cu C5, cum ar fi sindromul hemolitic uremic atipic (aHUS) sau hemoglobinurie paroxistică nocturnă (PNH). Termenul include subiecți umani care au sau sunt expuși riscului de a avea o astfel de boală sau tulburare.

Așa cum sunt utilizați aici, termenii „tratare”, „tratare” sau „tratament” se referă la reducerea sau ameliorarea severității a cel puțin unui simptom sau indicație a unei boli sau tulburări asociate cu C5 datorită administrării unui agent terapeutic. cum ar fi un anticorp al prezentei invenții la un subiect care are nevoie de acesta. Termenii includ inhibarea progresiei bolii sau agravarea unui simptom/indicație. Termenii includ, de asemenea, prognosticul pozitiv al bolii, adică subiectul poate fi lipsit de boală sau poate avea boală redusă la administrarea unui agent terapeutic cum ar fi un anticorp al prezentei invenții. Agentul terapeutic poate fi administrat subiectului într-o doză terapeutică.

Termenii "prevenire", "prevenire" sau "prevenire" se referă la inhibarea manifestării unei boli sau tulburări asociate cu C5 sau la orice simptome sau indicații ale unei astfel de boli sau tulburări la administrarea unui anticorp conform prezentei invenții.

Fragmente de anticorpi de legare la antigen

Dacă nu se indică în mod specific altfel, termenul "anticorp", așa cum este utilizat aici, va fi înțeles că include molecule de anticorp care cuprind două lanțuri grele de imunoglobuline și două lanțuri ușoare de imunoglobulină (adică, "molecule de anticorp complet") precum și fragmente ale acestora de legare la antigen. Termenii „porțiuni de legare la antigen” a unui anticorp, „fragment de legare la antigen” a unui anticorp și altele asemenea, așa cum sunt utilizate aici, includ orice polipeptidă sau glicoproteină care se leagă în mod specific la o polipeptidă naturală, obținută enzimatic, sintetică sau modificată genetic antigenul pentru a forma un complex. Termenii "fragment de legare la antigen" a unui anticorp, sau "fragment de anticorp", așa cum sunt utilizați aici, se referă la unul sau mai multe fragmente ale unui anticorp care păstrează capacitatea de a se lega în mod specific la proteina C5. Un fragment de anticorp poate include un fragment Fab, un fragment F(ab')₂, un fragment Fv, un fragment dAb, un fragment care conține o CDR sau o CDR izolată. În anumite realizări, termenul "fragment de legare la antigen" se referă la un fragment de polipeptid al unei molecule de legare la antigen multispecifică. Fragmentele de legare la antigen ale unui anticorp pot fi derivate, de exemplu, din molecule de anticorp complet folosind orice tehnică standard adecvată, cum ar fi digestia proteolitică sau tehnici de inginerie genetică recombinată care implică manipularea și exprimarea ADN-ului care codifică domenii variabile și (opțional) constante ale anticorpului. Un astfel de ADN este cunoscut și/sau este ușor disponibil din, de exemplu, surse comerciale, biblioteci de ADN (inclusiv, de exemplu, biblioteci de anticorpi fagi) sau poate fi sintetizat. ADN-ul poate fi secvențiat și manipulat chimic sau prin utilizarea tehnicilor de biologie moleculară, de exemplu, pentru a aranja unul sau mai multe domenii variabile și/sau constante într-o configurație adecvată sau pentru a introduce codoni, a crea resturi de cisteină, a modifica, adăuga sau șterge aminoacizi, etc.

Exemple nelimitative de fragmente de legare la antigen includ: (i) fragmente Fab; (ii) fragmente F(ab')₂; (iii) fragmente Fd; (iv) fragmente Fv; (v) molecule Fv (scFv) cu catenă unică; (vi) fragmente dAb; și (vii) unități minime de recunoaștere constând din resturile de aminoacizi care imită regiunea hipervariabilă a unui anticorp (de exemplu, o regiune izolată de determinare a complementarității (CDR) cum ar fi o peptidă CDR3) sau o peptidă FR3-CDR3-FR4 constrânsă. Alte molecule modificate, cum ar fi anticorpi specifici unui domeniu, anticorpi cu un singur domeniu, anticorpi cu deleție de domeniu, anticorpi himerici, anticorpi grefați cu CDR, diacorpi, triacorpi, tetracorpi, minicorpi, nanocorpi (de exemplu, nanocorpi monovalenți, nanocorpi bivalenți etc.), mici imunofarmaceutice modulare (SMIP) și domenii variabile IgNAR de rechin, sunt de asemenea cuprinse în expresia "fragment de legare la antigen", așa cum este utilizat aici.

Un fragment de legare la antigen al unui anticorp va cuprinde de obicei cel puțin un domeniu variabil. Domeniul variabil poate fi de orice dimensiune sau compoziție de aminoacizi și va cuprinde în general cel puțin un CDR, care este adiacent sau în cadru cu una sau mai multe secvențe cadru. În fragmentele de legare la antigen având un domeniu V_H asociat cu un domeniu V_L, domeniile V_H și V_L pot fi situate unul față de celălalt în orice aranjament adecvat. De exemplu, regiunea variabilă poate fi dimerică și conține dimeri V_H - V_H, V_H - V_L sau V_L - V_L. Alternativ, fragmentul de legare la antigen al unui anticorp poate conține un domeniu monomeric V_H sau V_L.

În anumite variante de realizare, un fragment de legare la antigen al unui anticorp poate conține cel puțin un domeniu variabil legat covalent la cel puțin un domeniu constant. Configurațiile exemplificative, nelimitative ale domeniilor variabile și constante care pot fi găsite într-un fragment de legare la antigen al unui anticorp al prezentei invenții includ: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; și (xiv) V_L-C_L. În orice configurație de domenii variabile și constante, incluzând oricare dintre configurațiile exemplificative enumerate mai sus, domeniile variabile și constante pot fi fie legate direct unul la altul, fie pot fi legate printr-o balama sau o regiune de legătură completă sau parțială. O regiune balama poate consta din cel puțin 2 (de exemplu, 5, 10, 15, 20, 40, 60 sau mai mulți) aminoacizi, care au ca rezultat o legătură flexibilă sau semiflexibilă între domenii variabile și/sau constante adiacente într-un singur moleculă polipeptidică. Mai mult, un fragment de legare la antigen al unui anticorp al prezentei invenții poate cuprinde un homo-dimer sau hetero-dimer (sau alt multimer) al oricăreia dintre configurațiile de domenii variabile și constante enumerate mai sus în asociere necovalentă unul cu celălalt și/ sau cu unul sau mai multe domenii monomerice V_H sau V_L (de exemplu, prin legătură(e) disulfurică).

Și în cazul moleculelor de anticorp complet, fragmentele de legare la antigen pot fi monospecifice sau multispecifice (de exemplu, bispecifice). Un fragment de legare la antigen multispecific al unui anticorp va cuprinde în mod tipic cel puțin două domenii variabile diferite, în care fiecare domeniu variabil este

capabil să se lege în mod specific la un antigen separat sau la un epitop diferit de pe același antigen. Orice format de anticorp multi-specific, inclusiv formatele de anticorp bispecific exemplificate dezvăluite aici, poate fi adaptat pentru utilizare în contextul unui fragment de legare la antigen al unui anticorp al prezentei invenții utilizând tehnici de rutină disponibile în domeniu.

5 **Prepararea anticorpilor umani**

Metodele pentru generarea de anticorpi umani la șoarecii transgenici sunt cunoscute în domeniu. Orice astfel de metode cunoscute pot fi utilizate în contextul prezentei invenții pentru a produce anticorpi umani care se leagă în mod specific la proteina C5.

10 Un imunogen care cuprinde oricare dintre următoarele poate fi utilizat pentru a genera anticorpi la proteina C5. În anumite variante de realizare, anticorpii invenției sunt obținuți de la șoareci imunizați cu o proteină C5 nativă de lungime completă (vezi, de exemplu, numărul de acces GenBank NP_001726.2) (SEQ ID NR: 355), sau cu ADN care codifică proteina sau fragment al acesteia. Alternativ, proteina sau un fragment al acesteia poate fi produs folosind tehnici biochimice standard și modificat și utilizat ca imunogen. În anumite realizări ale invenției, imunogenul este un fragment de proteină C5 care variază de
15 la aproximativ resturile de aminoacizi 19 - 1676 din SECV ID NR: 355.

În unele realizări, imunogenul poate fi o proteină C5 recombinantă sau un fragment al acesteia exprimat în *L. coli* sau în orice alte celule eucariote sau de mamifere, cum ar fi celulele ovarelor de hamster chinezesc (CHO).

20 Folosind tehnologia VELOCIMMUNE® (vezi, de exemplu, US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) sau orice altă metodă cunoscută pentru generarea de anticorpi monoclonali, anticorpii himeric de mare afinitate la C5 sunt inițial izolați având o regiune variabilă umană și o regiune constantă de șoarece. Tehnologia VELOCIMMUNE® implică generarea unui șoarece transgenic având un genom care cuprinde regiuni variabile ale lanțului greu și ușor uman legate operațional de loci de regiune constantă de șoarece endogene, astfel încât șoarecele produce un anticorp care cuprinde
25 o regiune variabilă umană și o regiune constantă de șoarece ca răspuns la stimularea antigenică. ADN-ul care codifică regiunile variabile ale lanțurilor grele și ușoare ale anticorpului este izolat și legat operațional la ADN-ul care codifică regiunile constante ale lanțului greu și ușor uman. ADN-ul este apoi exprimat într-o celulă capabilă să exprime anticorpul complet uman.

În general, un șoarece VELOCIMMUNE® este provocat cu antigenul de interes și celulele limfatice
30 (cum ar fi celulele B) sunt recuperate de la șoarecii care exprimă anticorpi. Celulele limfatice pot fi fuzionate cu o linie celulară de mielom pentru a prepara linii celulare de hibridom nemuritoare, iar astfel de linii celulare de hibridom sunt selectate și selectate pentru a identifica liniile celulare de hibridom care produc anticorpi specifici antigenului de interes. ADN-ul care codifică regiunile variabile ale lanțului greu și lanțului ușor poate fi izolat și legat de regiuni constante izotipice dorite ale lanțului greu și lanțului ușor.
35 O astfel de proteină anticorp poate fi produsă într-o celulă, cum ar fi o celulă CHO. Alternativ, ADN-ul care codifică anticorpii himeri specifici antigenului sau domeniile variabile ale lanțurilor ușoare și grele pot fi izolate direct din limfocitele specifice antigenului.

Inițial, anticorpii himeric de mare afinitate sunt izolați având o regiune variabilă umană și o regiune constantă de șoarece. Ca și în secțiunea experimentală de mai jos, anticorpii sunt caracterizați și selectați
40 pentru caracteristicile dorite, inclusiv afinitatea, selectivitatea, epitopul etc. Regiunile constante de șoarece sunt înlocuite cu o regiune constantă umană dorită pentru a genera anticorpul complet uman conform invenției, de exemplu IgG1 sau IgG4 de tip sălbatic sau modificată. În timp ce regiunea constantă selectată poate varia în funcție de utilizarea specifică, caracteristicile de legare a antigenului cu afinitate mare și specificitate țintă rezidă în regiunea variabilă.

45 **Bioechivalenți**

Anticorpii anti-C5 și fragmentele de anticorp descrise aici cuprind proteine având secvențe de aminoacizi care variază de cele ale anticorpilor descriși, dar care păstrează capacitatea de a lega proteina C5. Astfel de variante de anticorpi și fragmente de anticorpi cuprind una sau mai multe adăugiri, deleții sau substituții de aminoacizi în comparație cu secvența părinte, dar prezintă activitate biologică care este în
50 esență echivalentă cu cea a anticorpilor descriși. De asemenea, secvențele de ADN care codifică anticorpi descrise aici cuprind secvențe care cuprind una sau mai multe adăugiri, deleții sau substituții de nucleotide în comparație cu secvența dezvăluită, dar care codifică un anticorp sau un fragment de anticorp care este în esență bioechivalent cu un anticorp sau fragment de anticorp. descrise aici.

55 Două proteine de legare a antigenului, sau anticorpi, sunt considerate bioechivalente dacă, de exemplu, sunt echivalente farmaceutice sau alternative farmaceutice a căror rată și grad de absorbție nu prezintă o diferență semnificativă atunci când sunt administrate la aceeași doză molară în condiții experimentale similare, fie singure. doză sau doze multiple. Unii anticorpi vor fi considerați echivalenți sau alternative farmaceutice dacă sunt echivalenți în gradul de absorbție, dar nu în rata de absorbție și totuși pot fi considerați bioechivalenți, deoarece astfel de diferențe în rata de absorbție sunt intenționate și se reflectă

în etichetare, sunt nu sunt esențiale pentru atingerea concentrațiilor efective ale medicamentului în organism, de exemplu, pentru utilizarea cronică și sunt considerate nesemnificative din punct de vedere medical pentru produsul medicamentos studiat.

Într-un exemplu de realizare, două proteine de legare la antigen sunt bioechivalente dacă nu există diferențe semnificative clinic în ceea ce privește siguranța, puritatea sau potența lor.

Într-un exemplu de realizare, două proteine care leagă antigenul sunt bioechivalente dacă un pacient poate fi schimbat o dată sau de mai multe ori între produsul de referință și produsul biologic fără o creștere așteptată a riscului de efecte adverse, inclusiv o modificare semnificativă clinic a imunogenității sau diminuare a eficacității, în comparație cu terapia continuată fără o astfel de schimbare.

Într-un exemplu de realizare, două proteine de legare la antigen sunt bioechivalente dacă ambele acționează printr-un mecanism comun sau mecanisme de acțiune pentru starea sau condițiile de utilizare, în măsura în care astfel de mecanisme sunt cunoscute.

Bioechivalența poate fi demonstrată prin metode *in vivo* și/sau *in vitro*.

Măsurile de bioechivalență includ, de exemplu, (a) un test *in vivo* la oameni sau alte mamifere, în care concentrația anticorpului sau a metaboliților săi este măsurată în sânge, plasmă, ser sau alt fluid biologic în funcție de timp; (b) un test *in vitro* care a fost corelat cu datele de biodisponibilitate umană *in vivo* și care previne în mod rezonabil pentru acestea; (c) un test *in vivo* la oameni sau alte mamifere în care efectul farmacologic acut adecvat al anticorpului (sau al țintei acestuia) este măsurat în funcție de timp; și (d) într-un studiu clinic bine controlat care stabilește siguranța, eficacitatea sau biodisponibilitatea sau bioechivalența unui anticorp.

Variantele bioechivalente ale anticorpilor descriși aici pot fi construite, de exemplu, prin efectuarea diferitelor substituții de resturi sau secvențe sau eliminând resturile sau secvențele terminale sau interne care nu sunt necesare pentru activitatea biologică. De exemplu, resturile de cisteină care nu sunt esențiale pentru activitatea biologică pot fi șterse sau înlocuite cu alți aminoacizi pentru a preveni formarea de punți disulfură intramoleculare inutile sau incorecte la renaturare. În alte contexte, anticorpii bioechivalenți pot include variante de anticorpi cuprinzând modificări de aminoacizi, care modifică caracteristicile de glicozilare ale anticorpilor, de exemplu, mutații care elimină sau îndepărtează glicozilarea.

Anticorpi anti-C5 cuprinzând variante Fc

Conform anumitor realizări ale prezentei invenții, anticorpii anti-C5 sunt furnizați cuprinzând un domeniu Fc cuprinzând una sau mai multe mutații care sporesc sau diminuează legarea anticorpului la receptorul FcRn, de exemplu, la pH acid în comparație cu pH neutru. De exemplu, prezenta invenție include anticorpi anti-C5 cuprinzând o mutație în regiunea C_{H2} sau o regiune C_{H3} a domeniului Fc, în care mutația (mutația) crește afinitatea domeniului Fc pentru FcRn într-un mediu acid (de exemplu, într-un mediu acid). endozom unde pH-ul variază de la aproximativ 5,5 până la aproximativ 6,0). Astfel de mutații pot duce la o creștere a timpului de înjumătățire plasmatică a anticorpului atunci când este administrat unui animal. Exemple nelimitative de astfel de modificări Fc includ, de exemplu, o modificare la poziția 250 (de exemplu, E sau Q); 250 și 428 (de exemplu, L sau F); 252 (de exemplu, L/Y/F/W sau T), 254 (de exemplu, S sau T) și 256 (de exemplu, S/R/Q/E/D sau T); sau o modificare la poziția 428 și/sau 433 (de exemplu, H/L/R/S/P/Q sau K) și/sau 434 (de exemplu, A, W, H, F sau Y [N434A, N434W, N434H, N434F sau N434Y]); sau o modificare la poziția 250 și/sau 428; sau o modificare la poziția 307 sau 308 (de exemplu, 308F, V308F) și 434. Într-un exemplu de realizare, modificarea cuprinde o modificare 428L (de exemplu, M428L) și 434S (de exemplu, N434S); o modificare 428L, 259I (de exemplu, V259I) și 308F (de exemplu, V308F); o modificare 433K (de exemplu, H433K) și o modificare 434 (de exemplu, 434Y); o modificare 252, 254 și 256 (de exemplu, 252Y, 254T și 256E); o modificare 250Q și 428L (de exemplu, T250Q și M428L); și o modificare 307 și/sau 308 (de exemplu, 308F sau 308P). Într-un alt exemplu de realizare, modificarea cuprinde o modificare 265A (de exemplu, D265A) și/sau o modificare 297A (de exemplu, N297A).

De exemplu, prezenta invenție include anticorpi anti-C5 cuprinzând un domeniu Fc care cuprinde una sau mai multe perechi sau grupuri de mutații selectate din grupul constând din: 250Q și 248L (de exemplu, T250Q și M248L); 252Y, 254T și 256E (de exemplu, M252Y, S254T și T256E); 428L și 434S (de exemplu, M428L și N434S); 257I și 311I (de exemplu, P257I și Q311I); 257I și 434H (de exemplu, P257I și N434H); 376V și 434H (de exemplu, D376V și N434H); 307A, 380A și 434A (de exemplu, T307A, E380A și N434A); și 433K și 434F (de exemplu, H433K și N434F). Toate combinațiile posibile ale mutațiilor domeniului Fc de mai sus și alte mutații din domeniile variabile ale anticorpului dezvoltate aici, sunt avute în vedere în scopul prezentei invenții.

Prezenta invenție include, de asemenea, anticorpi anti-C5 cuprinzând o regiune himerică constantă a lanțului greu (C_H), în care regiunea himerică C_H cuprinde segmente derivate din regiunile C_H a mai mult de un izotip de imunoglobulină. De exemplu, anticorpii conform invenției pot cuprinde o regiune himerică

C_H care cuprinde parțial sau tot un domeniu C_{H2} derivat dintr-o moleculă IgG1 umană, IgG2 umană sau IgG4 umană, combinată cu o parte sau tot dintr-un domeniu C_{H3} derivat dintr-un IgG1 uman, IgG2 umană sau moleculă IgG4 umană. Conform anumitor variante de realizare, anticorpul invenției cuprind o regiune himerică C_H având o regiune balama himerică. De exemplu, o balama himerică poate cuprinde o secvență de aminoacizi „balama superioară” (reziduuri de aminoacizi din pozițiile 216 până la 227 conform numerotării UE) derivată dintr-o regiune balama IgG1 umană, o IgG2 umană sau o regiune balama IgG4 umană, combinată cu o „secvență de balama inferioară” (reziduuri de aminoacizi din pozițiile 228 la 236 conform numerotării UE) derivată dintr-o regiune balama IgG1 umană, IgG2 umană sau o regiune balama IgG4 umană. Conform anumitor variante de realizare, regiunea balama himerică cuprinde resturi de aminoacizi derivate dintr-o balama superioară IgG1 umană sau IgG4 umană și resturi de aminoacizi derivate dintr-o balama inferioară IgG2 umană. Un anticorp care cuprinde o regiune himerică C_H așa cum este descrisă aici poate, în anumite variante de realizare, să prezinte funcții efectoare Fc modificate fără a afecta negativ proprietățile terapeutice sau farmacocinetice ale anticorpului. (A se vedea, de exemplu, Publicația cererii de brevet SUA 2014/0243504).

Caracteristicile biologice ale anticorpilor

În general, anticorpul prezentei invenții funcționează prin legarea la proteina C5 și prevenind scindarea acesteia la C5a și C5b. De exemplu, anticorpul și fragmentele de anticorpi de legare la antigen descrise aici pot lega proteina C5 (de exemplu, la 25°C sau la 37°C) cu un K_D mai mic de 9 nM măsurat prin rezonanța plasmonului de suprafață, de exemplu, folosind testul format așa cum este definit în Exemplul 3 de aici. Anticorpul sau fragmentele acestora de legare la antigen pot lega C5 cu un K_D mai mic de aproximativ 9 nM, mai mic de aproximativ 5 nM, mai mic de aproximativ 2 nM, mai mic de aproximativ 1 nM, mai mic de aproximativ 500 pM, mai mic de 250 pM sau mai mic de 100 pM, măsurată prin rezonanța plasmonului de suprafață, de exemplu, folosind formatul de analiză așa cum este definit în Exemplul 3 de aici, sau un test substanțial similar.

Anticorpul și fragmentele de legare la antigen ale acestora descrise aici se pot lega la proteina C5 umană cu un timp de înjumătățire disociativ ($t_{1/2}$) mai mare de aproximativ 2 minute, măsurat prin rezonanța plasmonului de suprafață la 25°C, de exemplu, folosind un format de analiză definit în Exemplu 4 de aici, sau un test substanțial similar. Anticorpul sau fragmentele de legare la antigen pot lega proteina C5 cu un $t_{1/2}$ mai mare de aproximativ 5 minute, mai mare de aproximativ 10 minute, mai mare de aproximativ 30 de minute, mai mare de aproximativ 50 de minute, mai mare de aproximativ 100 de minute, mai mare de aproximativ 150 de minute, mai mare de aproximativ 200 de minute, sau mai mare de aproximativ 250 de minute, măsurată prin rezonanța plasmonului de suprafață la 25°C, de exemplu, utilizând un format de analiză așa cum este definit în Exemplul 3 de aici (de exemplu, formatul de captură a mAb sau de captură a antigenului), sau un test substanțial similar.

Anticorpul și fragmentele de legare la antigen ale acestora descrise aici se pot lega la proteina C5 umană cu un timp de înjumătățire disociativ ($t_{1/2}$) mai mare de aproximativ 1,5 minute, măsurat prin rezonanța plasmonului de suprafață la 37°C, de exemplu, utilizând un format de analiză așa cum este definit în Exemplu 4 de aici, sau un test substanțial similar. Anticorpul sau fragmentele de legare la antigen pot lega proteina C5 cu un $t_{1/2}$ mai mare de aproximativ 2 minute, mai mare de aproximativ 5 minute, mai mare de aproximativ 10 minute, mai mare de aproximativ 25 de minute, mai mare de aproximativ 50 de minute, mai mare de aproximativ 100 de minute, mai mare de aproximativ 150 de minute, sau mai mare de aproximativ 200 de minute, măsurată prin rezonanța plasmonului de suprafață la 37°C, de exemplu, utilizând un format de analiză așa cum este definit în Exemplul 3 de aici (de exemplu, formatul de captură a mAb sau de captură a antigenului), sau un test substanțial similar.

Anticorpul și fragmentele de anticorpi de legare la antigen descrise aici pot lega proteina C5 de maimuță (de exemplu, la 25°C sau la 37°C) cu un K_D mai mic de 120 nM, măsurat prin rezonanța plasmonului de suprafață, de exemplu, folosind formatul de analiză așa cum este definit. În Exemplul 3 de aici. Anticorpul sau fragmentele acestora de legare la antigen pot lega maimuța C5 cu un K_D mai mic de aproximativ 120 nM, mai puțin de aproximativ 100 nM, mai puțin de aproximativ 50 nM, mai puțin de aproximativ 25 nM, mai puțin de aproximativ 10 nM, mai puțin de aproximativ 5 nM, mai puțin de aproximativ 1 nM, mai puțin de aproximativ 500 pM, sau mai puțin de 250 pM, măsurat prin rezonanța plasmonului de suprafață, de exemplu, utilizând formatul de analiză așa cum este definit în Exemplul 3 de aici, sau un test substanțial similar.

Anticorpul și fragmentele de anticorpi de legare la antigen descrise aici se pot lega la proteina C5 umană modificată cu modificarea R885H (exemplificată prin SECV ID NR: 356) cu un K_D mai mic de 70 nM măsurat prin rezonanța plasmonului de suprafață, de exemplu, utilizând formatul de test definit. În Exemplul 3 de aici. Variantele C5 au arătat un răspuns slab la anticorpul anti-C5 dezvoltat anterior în domeniu (de exemplu, Nishimura și colab. 2014, New Engl. J. Med. 370: 632-639). Anticorpul sau fragmentele acestora de legare la antigen pot lega C5 uman modificat cu un K_D mai mic de aproximativ 65

nM, mai mic de aproximativ 50 nM, mai mic de aproximativ 20 nM, mai mic de aproximativ 10 nM, mai mic de aproximativ 5 nM, mai mic de aproximativ 3 nM sau mai mic. mai mult de 2 nM, măsurată prin rezonanța plasmonului de suprafață, de exemplu, folosind formatul de analiză definit în Exemplul 3 de aici, sau un test substanțial similar.

Anticorpul și fragmentele de anticorpi de legare la antigen descrise aici pot lega proteina C5 umană modificată cu modificarea R885C (exemplificată prin SECV ID NR: 357) cu un K_D mai mic de 160 nM măsurat prin rezonanța plasmonului de suprafață, de exemplu, utilizând formatul de analiză așa cum este definit. În Exemplul 3 de aici. Variantele C5 au arătat un răspuns slab la anticorpii anti-C5 dezvăluiți anterior în domeniu (de exemplu, Nishimura și colab. 2014, New Engl. J. Med. 370: 632-639). Anticorpul sau fragmentele acestora de legare la antigen pot lega C5 uman modificat cu un K_D de mai puțin de aproximativ 150 nM, mai puțin de aproximativ 100 nM, mai puțin de aproximativ 50 nM, mai puțin de aproximativ 20 nM, mai puțin de aproximativ 10 nM, mai puțin de aproximativ 5 nM sau mai puțin. mai mult de 2 nM, măsurată prin rezonanța plasmonului de suprafață, de exemplu, folosind formatul de analiză definit în Exemplul 3 de aici, sau un test substanțial similar.

Anticorpul și fragmentele de anticorpi de legare la antigen descrise aici pot inhiba citotoxicitatea dependentă de complement (CDC) cu IC_{50} mai mică de 10 nM măsurată printr-un test de luminescență, de exemplu, utilizând formatul de analiză definit în Exemplul 6 de aici. Anticorpul sau fragmentele acestora de legare la antigen pot inhiba CDC cu IC_{50} mai puțin de aproximativ 5 nM, mai puțin de aproximativ 3,5 nM sau mai puțin de aproximativ 2 nM, așa cum se măsoară printr-un test de luminescență a celulelor B, de exemplu, utilizând formatul de test definit în Exemplu 6 din prezenta, sau un test substanțial similar.

Anticorpul și fragmentele de legare la antigen descrise aici pot bloca hemoliza căii clasice (CP) mediată de C5 uman cu mai mult de 94% și cu un IC_{50} mai mic de 6 nM, măsurat printr-un test de hemoliză CP, de exemplu, folosind formatul de analiză definit în Exemplul 8 de aici. Anticorpul sau fragmentele acestora de legare la antigen pot bloca hemoliza CP cu IC_{50} mai puțin de aproximativ 6 nM, mai puțin de aproximativ 5 nM, mai puțin de aproximativ 4 nM, mai puțin de aproximativ 3 nM sau mai puțin de aproximativ 2 nM, măsurat prin testul de hemoliză CP, de exemplu, folosind formatul de analiză așa cum este definit în Exemplul 8 de aici, sau un test substanțial similar.

Anticorpul și fragmentele de legare la antigen descrise aici pot bloca hemoliza căii alternative (AP) mediate de C5 uman cu mai mult de 70% și cu un IC_{50} mai mic de 165 nM, măsurat printr-un test de hemoliză AP, de exemplu, folosind formatul de analiză definit în Exemplul 8 de aici. Anticorpul sau fragmentele acestora de legare la antigen pot bloca hemoliza AP cu IC_{50} mai puțin de aproximativ 160 nM, mai puțin de aproximativ 150 nM, mai puțin de aproximativ 100 nM, mai puțin de aproximativ 50 nM sau mai puțin de aproximativ 20 nM, așa cum se măsoară prin testul de hemoliză AP, folosind de ex. formatul de analiză așa cum este definit în Exemplul 8 de aici, sau un test substanțial similar.

Anticorpul și fragmentele de legare la antigen descrise aici pot bloca hemoliza căii clasice (CP) mediată de C5 de maimuța verde africană cu mai mult de 40% și cu un IC_{50} mai mic de 185 nM, măsurat printr-un test de hemoliză CP, de exemplu, folosind formatul testului ca definit în Exemplul 8 de aici. Anticorpul sau fragmentele acestora de legare la antigen pot bloca hemoliza CP cu IC_{50} mai puțin de aproximativ 180 nM, mai puțin de aproximativ 150 nM, mai puțin de aproximativ 100 nM, mai puțin de aproximativ 75 nM sau mai puțin de aproximativ 50 nM, așa cum se măsoară prin testul hemolizei CP, folosind testul de hemoliză CP. formatul de analiză așa cum este definit în Exemplul 8 de aici, sau un test substanțial similar.

Anticorpul și fragmentele de legare la antigen descrise aici pot bloca hemoliza căii alternative (AP) mediată de maimuța verde africană cu un IC_{50} mai mic de 235 nM, măsurat printr-un test de hemoliză AP, de exemplu, folosind formatul de analiză definit în Exemplul 8 de aici. Anticorpul sau fragmentele acestora de legare la antigen pot bloca hemoliza AP cu IC_{50} mai puțin de aproximativ 200 nM, mai puțin de aproximativ 150 nM, mai puțin de aproximativ 100 nM, mai puțin de aproximativ 50 nM sau mai puțin de aproximativ 20 nM, așa cum se măsoară prin testul de hemoliză AP, folosind de ex. formatul de analiză așa cum este definit în Exemplul 8 de aici, sau un test substanțial similar.

Anticorpul și fragmentele de legare la antigen descrise aici pot bloca mai mult de 90% din hemoliza pe calea clasică (CP) mediată de maimuța cynomolgus cu un IC_{50} mai mic de 145 nM, măsurat printr-un test de hemoliză CP, de exemplu, folosind formatul de analiză definit în Exemplul 8 de aici. Anticorpul sau fragmentele acestora de legare la antigen pot bloca hemoliza CP cu IC_{50} mai puțin de aproximativ 140 nM, mai puțin de aproximativ 120 nM, mai puțin de aproximativ 100 nM, mai puțin de aproximativ 75 nM sau mai puțin de aproximativ 50 nM, măsurat prin testul hemolizei CP, folosind testul de hemoliză CP. formatul de analiză așa cum este definit în Exemplul 8 de aici, sau un test substanțial similar.

Anticorpul și fragmentele de legare la antigen descrise aici pot bloca hemoliza căii alternative (AP) mediată de C5 de maimuța cynomolgus cu un IC_{50} mai mic de 30 nM, măsurat printr-un test de hemoliză AP, de exemplu, folosind formatul de analiză definit în Exemplul 8 de aici. Anticorpul sau fragmentele

acestora de legare la antigen pot bloca hemoliza AP cu IC_{50} mai puțin de aproximativ 25 nM, mai puțin de aproximativ 20 nM, mai puțin de aproximativ 10 nM, mai puțin de aproximativ 5 nM sau mai puțin de aproximativ 2 nM, măsurat prin testul de hemoliză AP, de ex., folosind formatul de analiză așa cum este definit în Exemplul 8 de aici, sau un test substanțial similar.

Anticorpul și fragmentele de legare la antigen descrise aici pot prezenta proprietăți farmacocinetice (PK) și farmacodinamice (PD) îmbunătățite în comparație cu anticorpii anti-C5 din domeniu. Anticorpii anti-C5 descriși aici prezintă o susceptibilitate mai mică la clearance-ul mediat de țintă la administrare, așa cum se arată în exemplele 9 și 10 de aici. Anticorpii anti-C5 și fragmentele acestora de legare la antigen pot prezenta concentrații serice pentru perioade lungi, de exemplu, mai mult de 20 de zile, mai mult de 25 de zile, mai mult de 30 de zile, mai mult de 35 de zile, mai mult de 40 de zile, mai mult de 45 de zile, mai mult de 50 de zile, mai mult de 55 de zile sau mai mult de 60 de zile, așa cum este descris în exemplele 9 și 10 de aici.

Anticorpii anti-C5 pot prezenta un timp de înjumătățire în ser prelungit de mai mult de 10 zile, în comparație cu anticorpii anti-C5 din domeniu.

Anticorpii anti-C5 și fragmentele acestora de legare la antigen pot avea afinitate mare pentru C5 uman (de exemplu, K_D mai puțin de 0,3 nM) și un clearance mai mic (de exemplu, timp de înjumătățire plasmatică prelungit, activitate farmacodinamică îmbunătățită pe mai multe zile decât anti-C5 cunoscut anterior). Astfel de anticorpi pot fi utilizați în mod avantajos cu dozare mai puțin frecventă la un subiect cu o boală sau tulburare asociată cu C5.

Într-un caz, prezenta de dezvoltare se referă la un anticorp recombinant izolat sau un fragment de legare la antigen al acestuia care se leagă în mod specific la proteina C5, în care anticorpul sau fragmentul acestuia prezintă una sau mai multe dintre următoarele caracteristici: (a) este un anticorp monoclonal complet uman; (b) se leagă de C5 uman cu o constantă de disociere (K_D) mai mică de 0,9 nM la 25°C, măsurată într-un test de rezonanță cu plasmoni de suprafață; (c) se leagă la C5 uman cu un K_D mai mic de 0,3 nM la 37°C, măsurat într-un test de rezonanță cu plasmon de suprafață; (d) are o concentrație în ser mai mare de 10 pg/mL până în ziua 70 la administrarea la maimuța cynomolgus; (e) blochează hemoliza CP- și AP până în ziua 35 la administrarea la maimuța cynomolgus, așa cum sa măsurat într-un test de hemoliză ex vivo; (f) are un timp de înjumătățire seric mai mare de 10 zile la maimuța cynomolgus; (g) are o concentrație serică mai mare de 10 pg/mL până în ziua 40 la administrarea la șoareci umanizați C5; (h) blochează hemoliza CP până în ziua 30 după administrarea la șoareci umanizați C5, așa cum sa măsurat într-un test de hemoliză ex vivo; și (i) are un timp de înjumătățire seric de mai mult de 10 zile la șoarecii umanizați C5.

Într-un caz, prezenta de dezvoltare se referă la un anticorp recombinant izolat sau un fragment de legare la antigen al acestuia care se leagă în mod specific la proteina C5, în care anticorpul sau fragmentul acestuia prezintă una sau mai multe dintre următoarele caracteristici: (a) este un anticorp monoclonal complet uman; (b) se leagă de C5 uman cu o constantă de disociere (K_D) mai mică de 0,9 nM la 25°C, măsurată într-un test de rezonanță cu plasmoni de suprafață; (c) se leagă la C5 uman cu un K_D mai mic de 0,3 nM la 37°C, măsurat într-un test de rezonanță cu plasmon de suprafață; (d) se leagă de maimuța C5 cu un K_D mai mic de 65 nM, măsurat într-un test de rezonanță plasmonică de suprafață; (e) se leagă la varianta umană C5 R885H (SECV ID NR: 356) cu un K_D mai mic de 0,5 nM, măsurat într-un test de rezonanță plasmonică de suprafață; (f) se leagă la varianta umană C5 R885C (SECV ID NR: 357) cu un K_D mai mic de 0,5 nM, măsurat într-un test de rezonanță plasmonică de suprafață; (g) blochează hemoliza căii clasice (CP) mediată de C5 uman cu mai mult de 95% și cu IC_{50} mai puțin de 6 nM, așa cum se măsoară într-un test de hemoliză CP; (h) blochează hemoliza căii alternative (AP) mediată de C5 uman cu mai mult de 70% și cu IC_{50} mai puțin de 165 nM, măsurată într-un test de hemoliză AP; (i) inhibă hemoliza CP mediată de C5 de maimuță verde africană cu IC_{50} mai mică de 185 nM, măsurată într-un test de hemoliză CP; (j) inhibă hemoliza AP mediată de C5 de maimuță verde africană cu IC_{50} mai mică de 235 nM, măsurată într-un test de hemoliză AP; (k) inhibă hemoliza CP mediată de C5 de maimuță cynomolgus cu IC_{50} mai mică de 145 nM, măsurată într-un test de hemoliză CP; și (l) inhibă hemoliza AP mediată de C5 de maimuță cynomolgus cu IC_{50} mai mică de 30 nM, așa cum se măsoară într-un test de hemoliză AP.

Anticorpii descriși aici pot avea una sau mai multe dintre caracteristicile biologice menționate mai sus, sau orice combinații ale acestora. Alte caracteristici biologice ale anticorpilor descriși aici vor fi evidente pentru o persoană cu calificare obișnuită în domeniu dintr-o trecere în revistă a prezentei dezvoltări, incluzând Exemplele de lucru de aici.

Cartografierea epitopilor și tehnologiile conexe

Prezenta invenție se referă la anticorpi anti-C5 care interacționează cu unul sau mai mulți aminoacizi găsiți în una sau mai multe regiuni ale moleculei proteinei C5, inclusiv polipeptida alfa și polipeptida beta. Epitopul la care se leagă anticorpii poate consta dintr-o singură secvență adiacentă de 3 sau mai multe (de exemplu, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17), 18, 19, 20 sau mai mulți)

aminoacizi localizați în oricare dintre domeniile menționate mai sus ale moleculei de proteină C5 (de exemplu, un epitop liniar într-un domeniu). Alternativ, epitopul poate consta dintr-o multitudine de aminoacizi necontigui (sau secvențe de aminoacizi) localizați în unul sau ambele domenii menționate mai sus ale moleculei de proteină (de exemplu, un epitop conformațional).

Pentru a determina dacă un anticorp „interacționează cu unul sau mai mulți aminoacizi” dintr-o polipeptidă sau o proteină pot fi utilizate diferite tehnici cunoscute persoanelor de specialitate în domeniu. Tehnicile exemplificative includ, de exemplu, teste de blocare încrucișată de rutină, cum ar fi cea descrisă în *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Alte metode includ analiza mutațională cu scanare al alaninei, analiza pe peptide blot (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), studii cristalografice de analiză a clivajului peptidic și analiză RMN. În plus, pot fi utilizate metode precum excizia epitopului, extracția epitopului și modificarea chimică a antigenelor (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496). O altă metodă care poate fi utilizată pentru a identifica aminoacizii dintr-o polipeptidă cu care un anticorp interacționează este schimbul de hidrogen/deuteriu detectat prin spectrometrie de masă. În termeni generali, metoda de schimb hidrogen/deuteriu implică marcarea cu deuteriu a proteinei de interes, urmată de legarea anticorpului de proteina marcată cu deuteriu. Apoi, complexul proteină/anticorp este transferat în apă și protonii schimbabili din aminoacizii care sunt protejați de complexul de anticorpi sunt supuși unui schimb invers deuteriu-hidrogen la o rată mai mică decât protonii schimbabili din aminoacizii care nu fac parte din interfață. Ca rezultat, aminoacizii care fac parte din interfața proteină/anticorp pot reține deuteriu și, prin urmare, prezintă o masă relativ mai mare în comparație cu aminoacizii care nu sunt incluși în interfață. După disocierea anticorpului, proteina țintă este supusă scindării cu protează și analizei spectrometriei de masă, dezvăluind astfel resturile marcate cu deuteriu care corespund aminoacizilor specifici cu care interacționează anticorpul. Vezi, de exemplu, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen și Smith (2001) *Anal. Chim.* 73: 256A-265A.

Termenul "epitop" se referă la un situs al unui antigen la care răspund celulele B și/sau T. Epitopii celulelor B pot fi formați atât din aminoacizi învecinați, cât și din aminoacizi necontigui juxtapuși prin plierea terțiară a unei proteine. Epitopii formați din aminoacizi adiacenți sunt de obicei reținuți la expunerea la solvenți denaturanți, în timp ce epitopii formați prin pliere terțiară se pierd în mod obișnuit la tratarea cu solvenți denaturanți. Un epitop include de obicei cel puțin 3, și mai de obicei, cel puțin 5 sau 8-10 aminoacizi într-o conformație spațială unică.

Profilarea asistată de modificare (MAP), cunoscută și sub denumirea de profilare a anticorpilor bazate pe structura antigenului (ASAP) este o metodă care clasifică un număr mare de anticorpi monoclonali (mAb) direcționați împotriva aceluiași antigen în funcție de asemănările profilului de legare al fiecărui anticorp la suprafețe antigene modificate chimic sau enzimatic (vezi US 2004/0101920). Fiecare categorie poate reflecta un epitop unic fie distinct diferit de epitopul reprezentat de o altă categorie, fie suprapus parțial cu epitopul reprezentat de altă categorie. Această tehnologie permite filtrarea rapidă a anticorpilor identici genetic, astfel încât caracterizarea poate fi concentrată pe anticorpi diferiți genetic. Când este aplicat la screeningul hibridomului, MAP poate facilita identificarea clonelor de hibridom rare care produc mAb având caracteristicile dorite. MAP poate fi utilizat pentru a sorta anticorpii conform invenției în grupuri de anticorpi care leagă diferiți epitopi.

Anticorpii anti-C5 sau fragmentele acestora de legare la antigen descrise aici pot lega un epitop în oricare sau mai multe dintre regiunile exemplificate în proteina C5, fie sub formă naturală, așa cum este exemplificată în SEQ ID NR: 355, fie produse recombinant, fie la un fragment din acesta. Anticorpii se pot lega la o regiune care cuprinde unul sau mai mulți aminoacizi selectați din grupul constând din resturile de aminoacizi 19 - 1676 ale proteinei C5 umane.

Anticorpii pot interacționa cu cel puțin o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din resturi de aminoacizi variind de la aproximativ poziția 19 până la aproximativ poziția 750; sau resturi de aminoacizi variind de la aproximativ poziția 751 până la aproximativ poziția 1676 din SECV ID NR: 355.

Anticorpii anti-C5 și fragmentele acestora de legare la antigen pot interacționa cu unul sau mai mulți epitopi găsiți în lanțul alfa și/sau beta al C5 (SECV ID NR: 359). Epitopul(ii) pot consta dintr-una sau mai multe secvențe contigue de 3 sau mai multe (de exemplu, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 sau mai mulți) aminoacizi localizați în lanțul alfa și/sau lanțul beta al C5. Alternativ, epitopul poate consta dintr-o multitudine de aminoacizi necontigui (sau secvențe de aminoacizi) localizate în C5. Așa cum se arată în exemplul 11 de aici, epitopul lui C5 cu care interacționează anticorpul conform invenției H4H12166P este definit prin: (i) secvența de aminoacizi NMGATGMDSW (SECV ID NR: 360) care corespunde aminoacizilor 591 până la 599 cuprinși în catenă beta a SECV ID NR: 359; și (ii) secvența de aminoacizi WEVHLVPRRKQLQFALPDSL (SECV ID NR: 361), care corespunde aminoacizilor 775 la 794 cuprinși în lanțul alfa al SECV ID NR: 359. În consecință, anticorpii anti-C5 pot interacționa cu unul sau mai mulți aminoacizi conținuți în regiunea constând din (i) secvența de aminoacizi NMGATGMDSW (SECV ID NR: 360), care corespunde aminoacizilor 591 la 599 din SECV ID NR: 359; și (ii) secvența de

aminoacizi WEVHLVPRRKQLQFALPDSL (SECV ID NR: 361), care corespunde aminoacizilor 775 la 794 din SECV ID NR: 359.

Prezenta dezvoltare include anticorpi anti-C5 care se leagă la același epitop, sau la o porțiune a epitopului, ca oricare dintre anticorpii exemplari specifici enumerați în Tabelul 1. De asemenea, prezenta dezvoltare include, de asemenea, anticorpi anti-C5 care concurează pentru legarea la proteina C5 sau un fragment al acesteia cu oricare dintre anticorpii exemplari specifici enumerați în Tabelul 1. De exemplu, anticorpi anti-C5 care concurează încrucișat pentru legarea la proteina C5 cu unul sau mai mulți anticorpi enumerați în tabelul 1.

Se poate determina cu ușurință dacă un anticorp se leagă la același epitop ca, sau concurează pentru legarea cu, un anticorp de referință anti-C5 utilizând metode de rutină cunoscute în domeniu. De exemplu, pentru a determina dacă un anticorp de testat se leagă la același epitop ca un anticorp de referință anti-C5, anticorpul de referință este lăsat să se lege la o proteină sau peptidă C5 în condiții de saturare. Apoi, se evaluează capacitatea unui anticorp de testare de a se lega la molecula de proteină C5. Dacă anticorpul de testat este capabil să se lege la C5 după legarea de saturație cu anticorpul de referință anti-C5, se poate concluziona că anticorpul de testat se leagă la un epitop diferit de anticorpul de referință anti-C5. Pe de altă parte, dacă anticorpul de testat nu este capabil să se lege de proteina C5 după legarea prin saturație cu anticorpul de referință anti-C5, atunci anticorpul de testat se poate lega de același epitop ca epitopul legat de anticorpul de referință anti-C5.

Pentru a determina dacă un anticorp concurează pentru legarea cu un anticorp de referință anti-C5, metodologia de legare descrisă mai sus este efectuată în două orientări: într-o primă orientare, anticorpul de referință este lăsat să se lege la o proteină C5 în condiții de saturare, urmată de evaluare. de legare a anticorpului de testat la molecula C5. Într-o a doua orientare, anticorpul de testat este lăsat să se lege la o moleculă C5 în condiții de saturare urmată de evaluarea legării anticorpului de referință la molecula C5. Dacă, în ambele orientări, doar primul anticorp (saturator) este capabil să se lege la molecula C5, atunci se ajunge la concluzia că anticorpul de testat și anticorpul de referință concurează pentru legarea la C5. După cum va fi apreciat de o persoană cu calificare obișnuită în domeniu, un anticorp care concurează pentru legarea cu un anticorp de referință nu se poate lega neapărat de epitopul identic ca și anticorpul de referință, dar poate bloca steric legarea anticorpului de referință prin legarea unei suprapunerii sau epitop adiacent.

Doi anticorpi se leagă la același epitop sau se suprapun dacă fiecare inhibă competitiv (blochează) legarea celuilalt la antigen. Adică, un exces de 1, 5, 10, 20 sau 100 de ori al unui anticorp inhibă legarea celuilalt cu cel puțin 50%, dar de preferință 75%, 90% sau chiar 99%, măsurat într-o legare competitivă. test (vezi, de exemplu, Junghans și colab., Cancer Res. 1990 50:1495-1502). Alternativ, doi anticorpi au același epitop dacă în esență toate mutațiile de aminoacizi din antigen care reduc sau elimină legarea unui anticorp reduc sau elimină legarea celuilalt. Doi anticorpi au epitopi suprapunerii dacă unele mutații de aminoacizi care reduc sau elimină legarea unui anticorp reduc sau elimină legarea celuilalt.

Experimentarea de rutină suplimentară (de exemplu, mutația peptidei și analizele de legare) pot fi apoi efectuate pentru a confirma dacă lipsa observată de legare a anticorpului de testat se datorează de fapt legării la același epitop ca și anticorpul de referință sau dacă blocarea sterică (sau alta fenomen) este responsabil pentru lipsa legării observate. Experimentele de acest fel pot fi efectuate utilizând ELISA, RIA, rezonanța plasmonilor de suprafață, citometria în flux sau orice alt test cantitativ sau calitativ de legare a anticorpilor disponibil în domeniu.

Imunoconjugate

Invenția cuprinde un anticorp monoclonal uman anti-C5 conjugat la un fragment terapeutic ("imunoconjugat"), pentru a trata o boală sau o tulburare asociată cu C5 (de exemplu, sindromul hemolitic uremic atipic). Așa cum este utilizat aici, termenul "imunoconjugat" se referă la un anticorp care este legat chimic sau biologic la un agent radioactiv, o citokină, un interferon, o porțiune țintă sau raportor, o enzimă, o peptidă sau proteină sau un agent terapeutic. Anticorpul poate fi legat de agentul radioactiv, citokină, interferon, fragment țintă sau raportor, enzimă, peptidă sau agent terapeutic în orice locație de-a lungul moleculei atâta timp cât este capabil să-și lege ținta. Exemplele de imunoconjugate includ conjugate de medicamente cu anticorpi și proteine de fuziune anticorp-toxină. Agentul poate fi un al doilea anticorp diferit la proteina C5. Tipul de fragment terapeutic care poate fi conjugat cu anticorpul anti-C5 și va ține cont de starea de tratat și de efectul terapeutic dorit de atins. Exemple de agenți adecvați pentru formarea imunoconjugatelor sunt cunoscute în domeniu; vezi, de exemplu, WO 05/103081.

Anticorpi multispecifici

Anticorpii prezentei invenții pot fi mono-specifici, bi-specifici sau multi-specifici. Anticorpii multispecifici pot fi specifici pentru diferiți epitopi ai unei polipeptide țintă sau pot conține domenii de legare la antigen specifice pentru mai mult de o polipeptidă țintă. Vezi, de exemplu, Tutt și colab., 1991, J. Immunol. 147:60-69 ; Kufer și colab., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244 .

Oricare dintre moleculele multispecifice de legare a antigenului din invenție, sau variante ale acestora, pot fi construite folosind tehnici biologice moleculare standard (de exemplu, ADN recombinant și tehnologia de exprimare a proteinelor), așa cum va fi cunoscut unei persoane de specialitate în domeniu.

Anticorpul specific C5 pot fi generați într-un format bispecific (un „bispecific”) în care regiunile variabile care se leagă la domenii distincte ale proteinei C5 sunt legate între ele pentru a conferi specificitate de domeniu dublu într-o singură moleculă de legare. Bispecificile proiectate corespunzător pot spori eficacitatea generală de inhibiție a proteinei C5 prin creșterea atât a specificității, cât și a avidității de legare. Regiunile variabile cu specificitate pentru domenii individuale, (de exemplu, segmente ale domeniului N-terminal) sau care se pot lega la diferite regiuni dintr-un domeniu, sunt împerecheate pe o schelă structurală care permite fiecărei regiuni să se lege simultan la epitopii separați sau la diferite regiuni dintr-un domeniu. Într-un exemplu pentru o bispecifică, regiunile variabile ale lanțului greu (V_H) dintr-un liant cu specificitate pentru un domeniu sunt recombinat cu regiuni variabile ale lanțului ușor (V_L) dintr-o serie de lianți cu specificitate pentru un al doilea domeniu pentru a identifica non-înrușiți. Parteneri V_L care pot fi asociați cu un V_H original fără a perturba specificul inițial pentru acel V_H . În acest fel, un singur segment V_L (de exemplu, V_{L1}) poate fi combinat cu două domenii diferite V_H (de ex., V_{H1} și V_{H2}) pentru a genera un bispecific format din două „brațe” obligatorii ($V_{H1}-V_{L1}$ și $V_{H2}-V_{L1}$). Utilizarea unui singur segment V_L reduce complexitatea sistemului și, prin urmare, simplifică și crește eficiența în procesele de clonare, expresie și purificare utilizate pentru a genera bispecific (vezi, de exemplu, USSN13/022759 și US2010/0331527).

Alternativ, anticorpul care leagă mai mult de un domeniu și o a doua țintă, cum ar fi, dar fără a se limita la, de exemplu, un al doilea anticorp diferit anti-C5, pot fi preparați într-un format bispecific folosind tehnici descrise aici sau alte tehnici cunoscute de specialiști în domeniu. Regiunile variabile ale anticorpului care se leagă la regiuni distincte pot fi legate împreună cu regiuni variabile care se leagă la situsuri relevante de pe, de exemplu, domeniul extracelular al C5, pentru a conferi specificitate antigen dublu într-o singură moleculă de legare. Bispecificile de această natură proiectate corespunzător au o dublă funcție. Regiunile variabile cu specificitate pentru domeniul extracelular sunt combinate cu o regiune variabilă cu specificitate pentru exteriorul domeniului extracelular și sunt împerecheate pe o schelă structurală care permite fiecărei regiuni variabile să se lege la antigenele separate.

Un exemplu de format de anticorp bispecific care poate fi utilizat în contextul prezentei invenții implică utilizarea unui prim domeniu C_{H3} de imunoglobulină (Ig) și a unui al doilea domeniu Ig C_{H3} , în care primul și al doilea domeniu Ig C_{H3} diferă unul de celălalt prin cel puțin un aminoacid, și în care cel puțin o diferență de aminoacid reduce legarea anticorpului bispecific la Proteina A în comparație cu un anticorp bispecific lipsit de diferența de aminoacid. Într-o variantă de realizare, primul domeniu Ig C_{H3} leagă proteina A și al doilea domeniu Ig C_{H3} conține o mutație care reduce sau elimină legarea proteinei A, cum ar fi o modificare H95R (prin numerotarea exonului IMGT; H435R prin numerotarea UE). Al doilea C_{H3} poate cuprinde în plus o modificare Y96F (de către IMGT; Y436F de către EU). Alte modificări care pot fi găsite în al doilea C_{H3} includ: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M și V82I (de către IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M și V422I de către EU) în cazul anticorpilor Ig1; N44S, K52N și V82I (IMGT; N384S, K392N și V422I de către EU) în cazul anticorpilor IgG2; și Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q și V82I (de către IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q și V422I de către UE) în cazul anticorpilor IgG4. Variațiile asupra formatului de anticorp bispecific descris mai sus sunt avute în vedere în scopul prezentei invenții.

Alte formate bispecifice exemplificative care pot fi utilizate în contextul prezentei invenții includ, fără limitare, de exemplu, formate bispecifice pe bază de scFv sau diabody, fuziuni IgG-scFv, domeniu dublu variabil (DVD)-Ig, Quadroma, butoane-în- gauri, lanț ușor comun (de exemplu, lanț ușor comun cu butoane în gauri etc.), CrossMab, CrossFab, corp (SEED), fermoar cu leucină, Duobody, IgG1/IgG2, Fab cu dublă acțiune (DAF)-IgG și Mab² formate bispecifice (a se vedea, de exemplu, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11, și referințele citate aici, pentru o revizuire a formatelor de mai sus). Anticorpul bispecific pot fi, de asemenea, construiți utilizând conjugarea peptidă/acid nucleic, de exemplu, în care aminoacizii nenaturali cu reactivitate chimică ortogonală sunt utilizați pentru a genera conjugați anticorp-oligonucleotide specifici locului care apoi se autoasamblează în complexe multimerice cu compoziție, valență și geometrie definite. (A se vedea, de exemplu, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Administrare și formulări terapeutice

Invenția furnizează compoziții terapeutice cuprinzând anticorpul anti-C5 sau fragmente ale acestora de legare la antigen din prezenta invenție. Compozițiile terapeutice în conformitate cu invenția vor fi administrate cu purtători adecvați, excipienți și alți agenți care sunt încorporați în formulări pentru a asigura transfer, eliberare, toleranță și altele asemenea îmbunătățite. O multitudine de formulări adecvate pot fi găsite în formularul cunoscut de toți chimiștii farmaceutici: Remington's Pharmaceutical Sciences,

Mack Publishing Company, Easton, PA. Aceste formulări includ, de exemplu, pulberi, paste, unguente, jeleuri, ceară, uleiuri, lipide, vezicule care conțin lipide (cationice sau anionice) (cum ar fi LIPOFECTIN™), conjugați ADN, paste de absorbție anhidre, ulei în apă și apă. emulsii în ulei, emulsii carbowax (polietilen glicoli de diferite greutate moleculare), geluri semi-solide și amestecuri semi-solide care conțin carbowax. Vezi, de asemenea, Powell et al. "Compendiu de excipienți pentru formulări parenterale" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Doza de anticorp poate varia în funcție de vârstă și mărimea subiectului care urmează să fie administrat, boala țintă, stări, calea de administrare și altele asemenea. Atunci când un anticorp conform prezentei invenții este utilizat pentru tratarea unei boli sau tulburări la un pacient adult sau pentru prevenirea unei astfel de boli, este avantajos să se administreze anticorpul prezentei invenții în mod normal la o singură doză de aproximativ 0,1 până la aproximativ 100 mg. /kg greutate corporală, mai preferabil aproximativ 5 până la aproximativ 80, aproximativ 10 până la aproximativ 70, sau aproximativ 20 până la aproximativ 50 mg/kg greutate corporală. În funcție de severitatea afecțiunii, frecvența și durata tratamentului pot fi ajustate. În anumite exemple de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia conform invenției poate fi administrat ca o doză inițială de cel puțin aproximativ 0,1 mg până la aproximativ 800 mg, aproximativ 1 până la aproximativ 600 mg, aproximativ 5 până la aproximativ 500 mg sau aproximativ 10 mg. la aproximativ 400 mg. În anumite exemple de realizare, doza inițială poate fi urmată de administrarea unei a doua doze ulterioare sau a mai multor doze ulterioare de anticorp sau fragment al acestuia de legare la antigen într-o cantitate care poate fi aproximativ aceeași sau mai mică decât cea a dozei inițiale, în care dozele ulterioare sunt separate de cel puțin 1 zi până la 3 zile; cel puțin o săptămână, cel puțin 2 săptămâni; cel puțin 3 săptămâni; cel puțin 4 săptămâni; cel puțin 5 săptămâni; cel puțin 6 săptămâni; cel puțin 7 săptămâni; cel puțin 8 săptămâni; cel puțin 9 săptămâni; cel puțin 10 săptămâni; cel puțin 12 săptămâni; sau cel puțin 14 săptămâni.

Sunt cunoscute diferite sisteme de livrare și pot fi utilizate pentru a administra compoziția farmaceutică a invenției, de exemplu, încapsularea în lipozomi, microparticule, microcapsule, celule recombinante capabile să exprime virusurile mutante, endocitoza mediată de receptor (vezi, de exemplu, Wu și colab. 1987) J. Biol. Chim. 262:4429-4432). Metodele de introducere includ, dar nu se limitează la acestea, căile intradermice, transdermice, intramusculare, intraperitoneale, intravenoase, subcutanate, intranasale, epidurale și orale. Compoziția poate fi administrată pe orice cale convenabilă, de exemplu prin perfuzie sau injectare în bolus, prin absorbție prin căptușeli epiteliale sau mucocutanate (de exemplu, mucoasa bucală, mucoasa rectală și intestinală, etc.) și poate fi administrată împreună cu alți agenți biologic activi. Administrarea poate fi sistemică sau locală. Compoziția farmaceutică poate fi de asemenea eliberată într-o veziculă, în special un lipozom (vezi, de exemplu, Langer (1990) Science 249:1527-1533).

Utilizarea nanoparticulelor pentru eliberarea anticorpilor din prezenta invenție este de asemenea avută în vedere aici. Nanoparticulele conjugate cu anticorpi pot fi utilizate atât pentru aplicații terapeutice, cât și pentru diagnostic. Nanoparticulele conjugate cu anticorpi și metodele de preparare și utilizare sunt descrise în detaliu de Arruebo, M., și colab. 2009 („Nanoparticule conjugate cu anticorpi pentru aplicații biomedicale” în J. Nanomat. Volumul 2009, ID articol 439389, 24 pagini, doi: 10.1155/2009/439389). Nanoparticulele pot fi dezvoltate și conjugate cu anticorpi conținuți în compozițiile farmaceutice pentru celulele țintă. Nanoparticulele pentru livrarea medicamentelor au fost de asemenea descrise în, de exemplu, US 8257740 sau US 8246995, fiecare încorporat aici în întregime.

În anumite situații, compoziția farmaceutică poate fi eliberată într-un sistem de eliberare controlată. Se poate folosi o pompă. Pot fi utilizate materiale polimerice. Un sistem cu eliberare controlată poate fi plasat în apropierea țintei compoziției, necesitând astfel doar o fracțiune din doza sistemică.

Preparatele injectabile pot include forme de dozare pentru injecții intravenoase, subcutanate, intracutanate, intracraniene, intraperitoneale și intramusculare, perfuzii prin picurare etc. Aceste preparate injectabile pot fi preparate prin metode cunoscute public. De exemplu, preparatele injectabile pot fi preparate, de exemplu, prin dizolvarea, suspendarea sau emulsionarea anticorpului sau a sării sale descrise mai sus într-un mediu apos steril sau într-un mediu uleios utilizat în mod convențional pentru injecții. Ca mediu apos pentru injecții, există, de exemplu, soluție salină fiziologică, o soluție izotonă care conține glucoză și alți agenți auxiliari, etc., care pot fi utilizate în combinație cu un agent de solubilizare adecvat, cum ar fi un alcool (de exemplu, etanol), un polialcool (de exemplu, propilen glicol, polietilen glicol), un agent activ de suprafață neionic [de exemplu, polisorbit 80, HCO-50 (aduct polioxietilen (50 mol) de ulei de ricin hidrogenat)] etc. Ca mediu uleios, se folosesc, de exemplu, ulei de susan, ulei de soia, etc., care pot fi utilizate în combinație cu un agent de solubilizare cum ar fi benzoat de benzii, alcool benzilic etc. Injecția astfel preparată este de preferință umplută într-o fiolă adecvată.

O compoziție farmaceutică a prezentei invenții poate fi administrată subcutanat sau intravenos cu un ac standard și o seringă. În plus, în ceea ce privește administrarea subcutanată, un dispozitiv de livrare a stiloului injector (pen) are aplicații în eliberarea unei compoziții farmaceutice conform prezentei invenții.

Un astfel de dispozitiv de livrare a stiloului injector (pen) poate fi reutilizabil sau de unică folosință. Un dispozitiv de livrare a stiloului injector (pen) reutilizabil utilizează în general un cartuș înlocuibil care conține o compoziție farmaceutică. Odată ce toată compoziția farmaceutică din cartuș a fost administrată și cartușul este gol, cartușul gol poate fi aruncat cu ușurință și înlocuit cu un cartuș nou care conține compoziția farmaceutică. Dispozitivul de livrare a stiloului poate fi apoi reutilizat. Într-un dispozitiv de livrare a stiloului injector (pen) de unică folosință, nu există un cartuș înlocuibil. Mai degrabă, dispozitivul de livrare a stiloului injector (pen) de unică folosință vine pre-umplut cu compoziția farmaceutică menținută într-un rezervor în interiorul dispozitivului. Odată ce rezervorul este golit de compoziția farmaceutică, întregul dispozitiv este aruncat.

Numeroase dispozitive de eliberare a stiloului injector (pen) și auto-injector reutilizabile au aplicații în administrarea subcutanată a unei compoziții farmaceutice conform prezentei invenții. Exemplele includ, dar cu siguranță nu se limitează la, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Marea Britanie), stiloul DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Elveția), stiloul HUMALOG MIX 75/25™, stiloul HUMALOG™, stiloul HUMALIN™ 70/30 (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II și III (Novo Nordisk, Copenhaga, Danemarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhaga, Danemarca), BD™ pen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ și OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germania), pentru a numi doar câteva. Exemple de dispozitive de livrare a stiloului injector (pen) de unică folosință care au aplicații în administrarea subcutanată a unei compoziții farmaceutice a prezentei invenții includ, dar cu siguranță nu se limitează la stiloul SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) și KWIKPEN™ (Eli Lilly), autoinjectorul SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germania), EPIPEN (Dey, L.P.) și stiloul HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), doar pentru a numi câteva.

În mod avantajos, compozițiile farmaceutice pentru utilizare orală sau parenterală descrise mai sus sunt preparate în forme de dozare într-o doză unitară potrivită pentru a se potrivi unei doze de ingrediente active. Astfel de forme de dozare într-o doză unitară includ, de exemplu, tablete, pastile, capsule, injecții (fiole), supozitoare etc. Cantitatea de anticorp conținută este în general de aproximativ 5 până la aproximativ 500 mg per formă de dozare într-o doză unitară; în special sub formă de injecție, este de preferat ca anticorpul să fie conținut în aproximativ 5 până la aproximativ 300 mg și în aproximativ 10 până la aproximativ 300 mg pentru celelalte forme de dozare.

Utilizări terapeutice ale anticorpilor

Anticorpii descriși aici sunt utili pentru tratamentul și/sau prevenirea unei boli sau tulburări sau afecțiuni asociate cu C5 și/sau pentru ameliorarea a cel puțin unui simptom asociat cu o astfel de boală, tulburare sau afecțiune. Un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia descris aici poate fi administrat într-o doză terapeutică unui pacient cu o boală sau tulburare sau stare asociată cu C5.

În anumite variante de realizare, anticorpii prezentei invenții sunt utili în tratarea sau prevenirea unui simptom sau indicație a sindromului hemolitic uremic atipic (aHUS). Simptomele și indicațiile SHUa includ, dar nu se limitează la, activarea trombocitelor, hemoliza, microangiopatia trombotică sistemică (formarea de cheaguri de sânge în vasele mici de sânge din întregul corp) care duce la accident vascular cerebral, atac de cord, insuficiență renală și/sau moarte, stadiul bolii renale, leziuni renale permanente, dureri abdominale, confuzie, edem, oboseală, greață/vărsături, diaree și anemie microangiopatică.

În anumite exemple de realizare, anticorpii prezentei invenții sunt utili în tratarea sau prevenirea unui simptom sau indicație de hemoglobinurie paroxistică nocturnă (PNH). Simptomele și indicațiile HPN includ, dar nu se limitează la, distrugerea globulelor roșii, tromboză (inclusiv tromboză venoasă profundă, embolie pulmonară), anemie hemolitică intravasculară, decolorarea roșie a urinei, simptome de anemie cum ar fi oboseală, dificultăți de respirație, și palpitații, dureri abdominale și dificultăți la înghițire.

În anumite variante de realizare, anticorpii prezentei invenții sunt utili pentru tratarea sau prevenirea a cel puțin unui simptom sau indicație a unei boli sau tulburări asociate C5 selectate din grupul constând din tulburări neurologice, tulburări renale, scleroză multiplă, accident vascular cerebral, sindrom Guillain Barre, leziuni cerebrale traumatiche, boala Parkinson, tulburări de activare inadecvată sau nedorită a complementului, complicații ale hemodializei, respingere hiperacută a alogrefei, respingere a xenogrefei, toxicitate indusă de interleukină-2 în timpul terapiei cu IL-2, tulburări inflamatorii, inflamarea bolilor autoimune, boala respiratorie a adultului, boala Crohn sindrom de suferință, leziuni termice, inclusiv arsuri sau degerături, afecțiuni post-ischemice de reperfuzie, infarct miocardic, sindrom de scurgere capilară, obezitate, diabet, boala Alzheimer, schizofrenie, accident vascular cerebral, epilepsie, ateroscleroză, vasculită, pemfigoidă buloasă, glomeronprofilifera, glomerulon-globulionă angioplastie, sindrom post-pompa în bypass cardiopulmonar sau bypass renal, hemodializă, ischemie renală, reperfuzie a arterei mezenterice după reconstrucție aortică, boli infecțioase sau sepsis, tulburări ale complexului imun și boli autoimune, nefropatie diabetică, sindrom Alport, insuficiență renală progresivă, boli proteinurice, leziune

de ischemie-reperfuze renală, nefrită lupică, glomerulopatie, artrită reumatoidă, lupus eritematos sistemic (LES), nefrită LES, nefrită membrano-proliferativă, anemie hemolitică, neuromielita optică, transplant renal, deficiență moștenită CD59, psoriazis și miastenia gravis. Anticorpul descriși aici pot fi utili pentru tratarea sau prevenirea a cel puțin unui simptom sau indicație a unei boli sau tulburări asociate C5 selectate din grupul constând din boli pulmonare și tulburări cum ar fi dispnee, hemoptizie, SDRA, astm, boala pulmonară obstructivă cronică (BPOC), emfizem, embolii și infarcte pulmonare, pneumonie, boli fibrogene ale prafului, leziuni datorate prafului și mineralelor inerte (de exemplu, siliciu, praf de cărbune, beriliu și azbest), fibroză pulmonară, boli ale prafului organic, leziuni chimice (din cauza iritantului). gaze și substanțe chimice, de exemplu, clor, fosgen, dioxid de sulf, hidrogen sulfurat, dioxid de azot, amoniac și acid clorhidric), leziuni cauzate de fum, leziuni termice (de exemplu, arsuri, îngheț), astm, alergii, bronhoconstricție, boli de hipersensibilitate, pneumonie, Sindromul Goodpasture, vasculită pulmonară, angioedem ereditar și inflamație asociată complexului imun.

Anticorpul descriși aici pot fi utili pentru a trata subiecții care suferă de o boală oculară cum ar fi degenerescența maculară legată de vârstă (AMD), edem macular diabetic (DME), retinopatia diabetică, angiogeneza oculară (neovascularizarea oculară care afectează țesutul coroidian, corneean sau retinian), atrofie geografică (AG), uveită și neuromielita optică. Anticorpul din prezenta invenție pot fi utilizați pentru a trata sau pentru a ameliora cel puțin un simptom sau indicație de AMD uscată sau AMD umedă. Anticorpul descriși aici pot fi utili în prevenirea sau încetinirea ratei pierderii vederii. Într-o variantă de realizare, anticorpul prezentei invenții sunt utili în reducerea druselor din ochiul unui subiect cu AMD uscat. Într-o variantă de realizare, anticorpul prezentei invenții sunt utili în prevenirea sau reducerea/încetinirea pierderii vederii la un subiect cu AMD.

Unul sau mai mulți anticorpi descriși aici pot fi administrați pentru a ameliora sau preveni sau scădea severitatea unuia sau mai multor simptome sau stări/indicații ale bolii sau tulburării oculare. Anticorpul pot fi utilizați pentru a ameliora sau reduce severitatea a cel puțin unui simptom, inclusiv, dar fără a se limita la, pierderea vederii, distorsiunea vizuală, dificultăți de adaptare la niveluri scăzute de lumină, vedere centrală strâmbă, creșterea opacității vederii centrale/totale, prezența de druse (acumulări mici de material extracelular care se acumulează pe retină), modificări pigmentare, vedere distorsionată sub formă de metamorfopsie, în care o rețea de linii drepte apare ondulată și părți ale rețelei pot apărea goale, modificări exsudative (hemoragii în ochiul, exsudatele dure, lichidul subretinian/sub-RPE/intraretinian), recuperarea lentă a funcției vizuale după expunerea la lumină puternică (test fotostress), atrofie incipientă și geografică, scăderea drastică a acuității vizuale (două niveluri sau mai mult), de exemplu, 20 /20 până la 20/80, modificări de perimetrie de hiperacuitate preferențială (pentru DMLA umedă), vedere încețoșată, pierderea treptată a vederii centrale (pentru cei cu degenerescență maculară non-exudativă, debut rapid a pierderii vederii (de multe ori cauzate de scurgeri și sângerare anormală a sângelui) vasele la subiecții cu degenerescență maculară exudativă, scotoame centrale (umbre sau zone lipsă de vedere), dificultăți în discernământul culorilor, în special cele închise de la cele închise și cele deschise de la cele deschise, pierderea sensibilității la contrast, liniile drepte apar curbate într-o grilă Amsler.

De asemenea, se are în vedere folosirea profilactică a unuia sau mai multor anticorpi ai celor descriși aici la subiecții cu risc de a dezvolta degenerescență maculară, cum ar fi subiecții cu vârsta peste 50 de ani, subiecții cu antecedente familiale de degenerescență maculară, fumătorii și subiecții cu obezitate crescută. colesterol, boli cardiovasculare sau dietă nesănătoasă.

Acești anticorpi pot fi utilizați pentru prepararea unei compoziții farmaceutice sau a unui medicament pentru tratarea pacienților care suferă de o boală sau tulburare asociată cu C5. Acești anticorpi pot fi utilizați ca terapie adjuvantă cu orice alt agent sau orice altă terapie cunoscută specialiștilor în domeniu utilă pentru tratarea sau ameliorarea unei boli sau tulburări asociate cu C5.

Terapii combinate

Terapiile combinate pot include un anticorp anti-C5 conform invenției și orice agent terapeutic suplimentar care poate fi combinat în mod avantajos cu un anticorp conform invenției sau cu un fragment activ biologic al unui anticorp conform invenției.

Anticorpul prezentei invenții pot fi combinați sinergic cu unul sau mai multe medicamente sau terapii utilizate pentru a trata o boală sau tulburare asociată cu C5. În unele exemple de realizare, anticorpul conform invenției pot fi combinați cu un al doilea agent terapeutic pentru a ameliora unul sau mai multe simptome ale bolii menționate.

În funcție de boala sau tulburarea asociată cu C5, anticorpul din prezenta invenție pot fi utilizați în combinație cu unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari incluzând, dar fără a se limita la, un anticoagulant (de exemplu, warfarină, aspirină, heparină, fenindionă, fondaparinux, idraparinux și inhibitori ai trombinei, cum ar fi argatroban, lepirudină, bivalirudină sau dabigatran) un medicament antiinflamator (de exemplu, corticosteroizi și medicamente antiinflamatoare nesteroidiene), un antihipertensiv (de exemplu, un inhibitor al enzimei de conversie a angiotensinei), un agent imunosupresor

(de exemplu, vincristină, ciclosporină A sau metotrexat), un agent fibrinolitic (de exemplu, ancrod, acid ϵ -aminocaproic, antiplasmin-ai, prostaciclina și defibrotidă), un agent de scădere a lipidelor, cum ar fi un inhibitor de hidroximetilglutaril CoA reductază, un agent anti-CD20 cum ar fi rituximab, un agent anti-TNF cum ar fi infliximab, un agent anti-convulsii (de exemplu, sulfat de magneziu), un inhibitor C3 sau un agent anti-trombotic.

În anumite exemple de realizare, al doilea agent terapeutic este un alt anticorp la proteina C5. Se are în vedere aici utilizarea unei combinații („cocktail”) de anticorpi cu activitate de neutralizare largă sau inhibitoare împotriva C5. În unele exemple de realizare, anticorpii care nu concurează pot fi combinați și administrați unui subiect care are nevoie de acestea. În unele exemple de realizare, anticorpii care cuprind combinația se leagă la epitopi diferiți care nu se suprapun pe proteină. Anticorpii care cuprind combinația pot bloca legarea C5 la C5 convertază și/sau pot preveni/inhiba scindarea C5 în C5a și C5b. În anumite realizări, cel de-al doilea anticorp poate avea timp de înjumătățire mai lung în serul uman.

Așa cum este utilizat aici, termenul „în combinație cu” înseamnă că component(e) activ(e) terapeutic suplimentar(e) poate fi administrat(e) înainte, concomitent cu sau după administrarea anticorpului anti-C5 din prezenta invenție. Termenul „în combinație cu” include, de asemenea, administrarea secvențială sau concomitentă a unui anticorp anti-C5 și a unui al doilea agent terapeutic.

Componenta(ele) activă(e) terapeutic suplimentar(e) pot fi administrate unui subiect înainte de administrarea unui anticorp anti-C5 din prezenta invenție. De exemplu, o primă componentă poate fi considerată a fi administrată „înainte de” a doua componentă dacă prima componentă este administrată cu 1 săptămână înainte, 72 ore înainte, 60 ore înainte, 48 ore înainte, 36 ore înainte, 24 ore înainte, 12 ore înainte, ore înainte, cu 6 ore înainte, cu 5 ore înainte, cu 4 ore înainte, cu 3 ore înainte, cu 2 ore înainte, cu 1 oră înainte, cu 30 minute înainte, cu 15 minute înainte, cu 10 minute înainte, cu 5 minute înainte sau cu mai puțin de 1 minut înainte de administrare a celei de-a doua componente. În alte variante de realizare, componenta(ele) activă(e) terapeutic suplimentar(e) pot fi administrate unui subiect după administrarea unui anticorp anti-C5 din prezenta invenție. De exemplu, o primă componentă poate fi considerată a fi administrată „după” o a doua componentă dacă prima componentă este administrată la 1 minut după, 5 minute după, 10 minute după, 15 minute după, 30 minute după, 1 oră după, 2 ore după, 3 ore după, 4 ore după, 5 ore după, 6 ore după, 12 ore după, 24 ore după, 36 ore după, 48 ore după, 60 ore după, 72 ore după administrarea celui de-al doilea component. În încă alte exemple de realizare, componenta(ele) activă(e) terapeutic suplimentar(e) pot fi administrate unui subiect concomitent cu administrarea unui anticorp anti-C5 din prezenta invenție. Administrarea „concomitentă”, în scopurile prezentei invenții, include, de exemplu, administrarea unui anticorp anti-C5 și a unui component suplimentar activ terapeutic la un subiect într-o formă de dozare unică sau în forme de dozare separate administrate subiectului în aproximativ 30 de ani. minute sau mai puțin unul de celălalt. Dacă este administrată în forme de dozare separate, fiecare formă de dozare poate fi administrată prin aceeași cale (de exemplu, atât anticorpul anti-C5, cât și componenta suplimentară activă terapeutic pot fi administrate intravenos, etc.); în mod alternativ, fiecare formă de dozare poate fi administrată pe o cale diferită (de exemplu, anticorpul anti-C5 poate fi administrat intravenos, iar componenta suplimentară activă terapeutic poate fi administrată oral). În orice caz, administrarea componentelor într-o singură doză din, în forme de dozare separate pe aceeași cale sau în forme de dozare separate pe căi diferite sunt considerate toate „administrare concomitentă”, în scopurile prezentei dezvăluiri. Pentru scopurile prezentei dezvăluiri, administrarea unui anticorp anti-C5 „înainte de”, „concomitent cu” sau „după” (așa cum acești termeni sunt definiți mai sus) administrarea unei componente suplimentare active terapeutic este considerată administrarea unui anti - Anticorp C5 „în combinație cu” o componentă activă terapeutic suplimentară.

Prezenta invenție include compoziții farmaceutice în care un anticorp anti-C5 al prezentei invenții este co-formulat cu una sau mai multe dintre componentele suplimentare activ(e) terapeutic așa cum este descris în altă parte aici.

Regimuri de administrare

O singură doză dintr-un anticorp anti-C5 descris aici (sau o compoziție farmaceutică care cuprinde o combinație de anticorp anti-C5 și oricare dintre agenții activi terapeutic suplimentari menționați aici) poate fi administrată unui subiect care are nevoie de aceasta. Doze multiple de anticorp anti-C5 (sau o compoziție farmaceutică care cuprinde o combinație de anticorp anti-C5 și oricare dintre agenții activi terapeutic suplimentari menționați aici) pot fi administrate unui subiect pe o perioadă de timp definită. Metodele conform acestui aspect cuprind administrarea secvențială la un subiect de doze multiple de anticorp anti-C5 descris aici. Așa cum este utilizat aici, „administrarea secvențială” înseamnă că fiecare doză de anticorp anti-C5 este administrată subiectului la un moment diferit de timp, de exemplu, în zile diferite separate printr-un interval predeterminat (de exemplu, ore, zile, săptămâni sau luni). Prezenta dezvăluire include metode care cuprind administrarea secvențială la pacient a unei singure doze inițiale de

anticorp anti-C5, urmată de una sau mai multe doze secundare de anticorp anti-C5 și, opțional, urmată de una sau mai multe doze terțiare de anti-C5. anticorp C5.

Termenii "doză inițială", "doze secundare" și "doze terțiare" se referă la secvența temporală de administrare a anticorpului anti-C5 descrisă aici. Astfel, "doza inițială" este doza care este administrată la începutul regimului de tratament (denumită și "doză de bază"); "dozele secundare" sunt dozele care sunt administrate după doza inițială; iar "dozele terțiare" sunt dozele care sunt administrate după dozele secundare. Dozele inițiale, secundare și terțiare pot conține toate aceeași cantitate de anticorp anti-C5, dar în general pot diferi una de cealaltă în ceea ce privește frecvența administrării. În anumite aspecte, totuși, cantitatea de anticorp anti-C5 conținută în dozele inițiale, secundare și/sau terțiare variază una de la alta (de exemplu, ajustată în sus sau în jos după caz) în timpul tratamentului. În anumite aspecte, două sau mai multe (de exemplu, 2, 3, 4 sau 5) doze sunt administrate la începutul regimului de tratament ca „doze de încărcare” urmate de doze ulterioare care sunt administrate mai puțin frecvent (de exemplu, „doze de întreținere”).

Fiecare doză secundară și/sau terțiară poate fi administrată timp de 1 până la 48 de ore (de exemplu, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ sau mai mult) după doza imediat anterioară. Expresia „doza imediat anterioară”, așa cum este utilizată aici, înseamnă, într-o secvență de administrări multiple, doza de anticorp anti-C5 care este administrată unui pacient înainte de administrarea dozei următoare în secvența fără intervenție doze.

Metodele conform acestui aspect pot cuprinde administrarea unui pacient a oricărui număr de doze secundare și/sau terțiare de anticorp anti-C5.

De exemplu, în anumite aspecte, pacientului i se administrează doar o singură doză secundară. În alte aspecte, două sau mai multe (de exemplu, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 sau mai multe) doze secundare sunt administrate pacientului. La fel, în anumite aspecte, pacientului i se administrează doar o singură doză terțiară. În alte aspecte, două sau mai multe (de exemplu, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 sau mai multe) doze terțiare sunt administrate pacientului.

Frecvența la care dozele secundare și/sau terțiare sunt administrate unui pacient poate varia pe parcursul regimului de tratament. Frecvența de administrare poate fi, de asemenea, ajustată în timpul tratamentului de către un medic, în funcție de nevoile pacientului în parte după examenul clinic.

Utilizări ale anticorpilor pentru diagnosticare

Anticorpii anti-C5 ai prezentei invenții pot fi utilizați pentru a detecta și/sau măsura C5 într-o probă, de exemplu, în scopuri de diagnosticare. Unele aspecte au în vedere utilizarea unuia sau mai multor anticorpi ai prezentei invenții în teste pentru a detecta o boală sau o tulburare asociată cu C5. Exemple de teste de diagnostic pentru C5 pot cuprinde, de exemplu, punerea în contact a unei probe, obținute de la un pacient, cu un anticorp anti-C5 conform invenției, în care anticorpul anti-C5 este marcat cu o moleculă marcatoare sau reporter detectabilă sau utilizat ca ligand de captare, pentru a izola selectiv C5 din probele pacientului. Alternativ, un anticorp anti-C5 nemarcat poate fi utilizat în aplicații de diagnostic în combinație cu un anticorp secundar care este el însuși marcat detectabil. Eticheta detectabilă sau molecula reporter poate fi un radioizotop, cum ar fi ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S sau ^{125}I ; un fragment fluorescent sau chemiluminiscent, cum ar fi izotiocianat de fluoresceină sau rodamină; sau o enzimă cum ar fi fosfatază alcalină, β -galactozidază, peroxidază de hrean sau luciferază. Testele exemplificative specifice care pot fi utilizate pentru a detecta sau măsura C5 într-o probă includ testul imunosorbent legat de enzime (ELISA), radioimunotestul (RIA) și sortarea celulelor activate de fluorescență (FACS).

Probele care pot fi utilizate în testele de diagnosticare C5 includ orice probă de țesut sau fluid obținută de la un pacient, care conține cantități detectabile fie de proteină C5, fie fragmente ale acesteia, în condiții normale sau patologice. În general, nivelurile de proteină C5 dintr-o probă particulară obținută de la un pacient sănătos (de exemplu, un pacient care nu suferă de o boală asociată cu C5) vor fi măsurate pentru a stabili inițial un nivel de referință, sau standard, de C5. Acest nivel de bază al C5 poate fi apoi comparat cu nivelurile de C5 măsurate în probe obținute de la indivizi suspecți de a avea o afecțiune asociată cu C5 sau simptome asociate cu o astfel de afecțiune.

Anticorpii specifici pentru proteina C5 pot să nu conțină etichete sau fragmente suplimentare sau pot conține un marcaj sau fragment N-terminal sau C-terminal. Într-un aspect, eticheta sau fragmentul este biotina. Într-un test de legare, locația unei etichete (dacă există) poate determina orientarea peptidului în raport cu suprafața pe care este legată peptida. De exemplu, dacă o suprafață este acoperită cu avidină, o peptidă care conține o biotină N-terminală va fi orientată astfel încât porțiunea C-terminală a peptidului să fie distală față de suprafață.

EXEMPLE

Următoarele exemple sunt ilustrative, dar nu limitează domeniul de aplicare al revendicărilor.

Exemplul 1: Generarea de anticorpi umani pentru a completa proteina factorului 5 (C5).

Anticorpul uman la proteina C5 au fost generați într-un șoarece VELOCIMUNE® cuprinzând ADN care codifică regiuni variabile ale lanțului greu de imunoglobuline umane și ale lanțului ușor kappa. Șoarecii au fost imunizați cu proteină C5 umană purificată cu ser (Calbiochem Cat #20-4888).

Răspunsul imun al anticorpilor a fost monitorizat printr-un test imunologic specific C5. Când s-a obținut un răspuns imun dorit, splenocitele au fost recoltate și fuzionate cu celule de mielom de șoarece pentru a-și păstra viabilitatea și a forma linii celulare de hibridom. Liniile celulare de hibridom au fost verificate și selectate pentru a identifica liniile celulare care produc anticorpi specifici C5. Liniile celulare au fost utilizate pentru a obține mai mulți anticorpi himeric anti-C5 (adică, anticorpi care posedă domenii variabile umane și domenii constante de șoarece); anticorpul exemplari generați în acest mod au fost denumiți ca H2M11683N și H2M11686N.

Anticorpul anti-C5 au fost, de asemenea, izolați direct din celulele B de șoarece pozitive pentru antigen, fără fuziune cu celulele de mielom, așa cum este descris în brevetul U.S. 7582298. Folosind această metodă, s-au obținut câțiva anticorpi anti-C5 complet umani (adică anticorpi care posedă domenii variabile umane și domenii constante umane); Exemple de anticorpi generați în acest mod au fost denumiți ca H4H12159P, H4H12161P, H4H12163P, H4H12164P, H4H12166P, H4H12167P, H4H12168P, H4H12169P, H4H12170P, H4H12171P, H4H12175 P, H4H12176P2, H4H12177P2 și H4H12183P2.

Proprietățile biologice ale anticorpilor exemplari generați în conformitate cu metodele din acest exemplu sunt descrise în detaliu în exemplele prezentate mai jos.

Exemplul 2: Secvențe de aminoacizi și nucleotide din regiunea variabilă a lanțului greu și ușor

Tabelul 1 prezintă identificatorii secvenței de aminoacizi ai regiunilor variabile ale lanțului greu și ușor și CDR-urile anticorpilor anti-C5 selectați așa cum sunt dezvoltate aici.

Tabelul 1: Identificatori de secvență de aminoacizi

	SECV ID NOs:							
Denumire anticorp	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H2M11683N	2	4	6	8	10	12	14	16
H2M11686N	18	20	22	24	26	28	30	32
H4H12159P	34	36	38	40	42	44	46	48
H4H12161P	50	52	54	56	58	60	62	64
H4H12163P	66	68	70	72	74	76	78	80
H4H12164P	82	84	86	88	90	92	94	96
H4H12166P	98	100	102	104	106	108	110	112
H4H12166P2	98	100	102	104	114	116	118	120
H4H12166P3	122	124	126	128	106	108	110	112
H4H12166P4	98	100	102	104	130	132	134	136
H4H12166P5	138	140	142	144	106	108	110	112
H4H12166P6	146	148	150	152	106	108	110	112
H4H12166P7	122	124	126	128	130	132	134	136
H4H12166P8	146	148	150	152	114	116	118	120
H4H12166P9	146	148	150	152	130	132	134	136
H4H12166P10	138	140	142	144	130	132	134	136
H4H12167P	154	156	158	160	162	164	166	168
H4H12168P	170	172	174	176	178	180	182	184
H4H12169P	186	188	190	192	194	196	198	200
H4H12170P	202	204	206	208	210	212	214	216
H4H12171P	218	220	222	224	226	228	230	232

H4H12175P	234	236	238	240	242	244	246	248
H4H12176P2	250	252	254	256	258	260	262	264
H4H12177P2	266	268	270	272	258	260	262	264
H4H12183P2	274	276	278	280	282	284	286	288
H2M11682N	290	292	294	296	298	300	302	304
H2M11684N	306	308	310	312	314	316	318	320
H2M11694N	322	324	326	328	330	332	334	336
H2M11695N	338	340	342	344	346	348	350	352

Identificatorii de secvență de acid nucleic corespunzători sunt prezentați în Tabelul 2.

Tabelul 2: Identificatori de secvență de acid nucleic

5

	SECV ID NOs:							
Denumire anticorp	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H2M11683N	1	3	5	7	9	11	13	15
H2M11686N	17	19	21	23	25	27	29	31
H4H12159P	33	35	37	39	41	43	45	47
H4H12161P	49	51	53	55	57	59	61	63
H4H12163P	65	67	69	71	73	75	77	79
H4H12164P	81	83	85	87	89	91	93	95
H4H12166P	97	99	101	103	105	107	109	111
H4H12166P2	97	99	101	103	113	115	117	119
H4H12166P3	121	123	125	127	105	107	109	111
H4H12166P4	97	99	101	103	129	131	133	135
H4H12166P5	137	139	141	143	105	107	109	111
H4H12166P6	145	147	149	151	105	107	109	111
H4H12166P7	121	123	125	127	129	131	133	135
H4H12166P8	145	147	149	151	113	115	117	119
H4H12166P9	145	147	149	151	129	131	133	135
H4H12166P10	137	139	141	143	129	131	133	135
H4H12167P	153	155	157	159	161	163	165	167
H4H12168P	169	171	173	175	177	179	181	183
H4H12169P	185	187	189	191	193	195	197	199
H4H12170P	201	203	205	207	209	211	213	215
H4H12171P	217	219	221	223	225	227	229	231
H4H12175P	233	235	237	239	241	243	245	247
H4H12176P2	249	251	253	255	257	259	261	263
H4H12177P2	265	267	269	271	257	259	261	263
H4H12183P2	273	275	277	279	281	283	285	287
H2M11682N	289	291	293	295	297	299	301	303

H2M11684N	305	307	309	311	313	315	317	319
H2M11694N	321	323	325	327	329	331	333	335
H2M11695N	337	339	341	343	345	347	349	351

La anticorpi se face referire în mod obișnuit aici conform următoarei nomenclaturi: prefixul Fc (de ex. „H4H”, „H2M” etc.), urmat de un identificator numeric (de exemplu, „11686”, „12166”, „12183” etc., după cum se arată în Tabelul 2), urmat de „P”, „P2” ”, sau sufixul „N”. Astfel, conform acestei nomenclaturi, un anticorp poate fi denumit aici, de exemplu, "H2M11686N", "H4H12183P2", "H4H12168P" etc. Prefixele H4H și H2M de pe denumirile anticorpilor utilizate aici indică izotipul particular al regiunii Fc a anticorpului. De exemplu, un anticorp „H4H” are un Fc IgG4 uman care cuprinde o mutație serină la prolină în regiunea balama (S108P) pentru a promova stabilizarea dimerului, iar un anticorp „H2M” are un Fc IgG2 de șoarece (izotip a sau b) (toate regiunile variabile sunt complet umane, așa cum este notat de primul „H” din denumirea anticorpului). După cum va fi apreciat de o persoană cu calificare obișnuită în domeniu, un anticorp având un izotip Fc particular poate fi convertit într-un anticorp cu un izotip Fc diferit (de exemplu, un anticorp cu un Fc IgG1 de șoarece poate fi convertit într-un anticorp cu un IgG4 umană, etc.), dar în orice caz, domeniile variabile (inclusiv CDR-urile) - care sunt indicate de identificatorii numerici prezentați în Tabelul 2 - vor rămâne aceleași, iar proprietățile de legare la antigen sunt de așteptat să fie identice sau substanțial similare indiferent de natura domeniului Fc.

În anumite variante de realizare, anticorpii selectați cu un Fc IgG1 de șoarece au fost transformați în anticorpi cu Fc IgG4 uman. Într-o variantă de realizare, domeniul IgG4 Fc cuprinde 2 sau mai multe modificări de aminoacizi așa cum este dezvăluit în US20100331527.

Pentru a genera anticorpi mutați, diferite reziduuri din regiunile determinate complementare (CDR) ale H4H12166P au fost mutate în histidină pentru a genera 9 anticorpi mutați, identificați ca H4H12166P2 la H4H12166P10. S-a demonstrat că mutațiile histidinei din CDR-uri conferă o dependență de pH a legării la antigenul țintă, ceea ce duce la o farmacocinetică îmbunătățită (Igawa și colab. 2010, Nat. Biotechnology. 28: 1203-1207).

Construcțiile de control utilizate în următoarele exemple

Următoarele construcții de control (anticorpi anti-C5) au fost incluse în experimentele dezvăluite aici, în scopuri comparative: "Comparator 1", un anticorp monoclonal împotriva C5 uman având secvențele V_H/V_L ale anticorpului "h5G1.1" conform brevetului US nr. 6.355.245 (Alexion Pharmaceuticals, Inc.); și "Comparator 2", un anticorp monoclonal uman împotriva C5 uman având secvențele V_H/V_L ale anticorpului "8109" conform Publicației cererii de brevet US Nr. 2013/0022615 (Novartis).

Exemplul 3: Legarea anticorpului la C5, determinată prin rezonanța plasmonului de suprafață

Constantele de disociere de echilibru (valori K_D) pentru legarea C5 la anticorpii anti-C5 purificați au fost determinate utilizând un test biosenzor de rezonanță plasmonică de suprafață în timp real pe un instrument Biacore T200. Suprafața senzorului Biacore a fost derivatizată prin cuplarea amină cu un anticorp monoclonal de șoarece anti-Fc uman (GE Healthcare, # BR-1008-39) pentru a captura anticorpi anti-C5 exprimați cu regiuni constante Fc umane. Studiile de legare Biacore au fost efectuate în tampon de rulare HBST (0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% v/v Surfactant P20). C5 uman a fost obținut dintr-o sursă comercială (EMD). Alți reactivi C5 au fost exprimați cu o etichetă myc-myc-hexahistidină C-terminală (denumită ulterior C5-mmh). Reactivii umani C5-mmh au fost, de asemenea, exprimați conținând mutații punctuale de histidină și cisteină la arginină 885 (denumită ulterior C5 R885H-mmh și, respectiv, C5 R885C-mmh). Diferite concentrații de C5 uman, C5 uman R885H-mmh (SECV ID Nr.: 356), C5 uman R885C-mmh (SECV ID Nr.: 357) și C5-mmh de maimuță (SECV ID Nr.: 358) (variind de la 100 nM la 1,23 nM, diluții de 3 ori) preparate în tampon de rulare HBST au fost injectate pe suprafața capturată cu anticorp anti-C5 la un debit de 30 uL/min. Asocierea tuturor reactanților C5 la fiecare dintre anticorpii monoclonali capturați a fost monitorizată timp de 3 minute și disocierea lor în tampon de rulare HBST a fost monitorizată timp de 8 minute. Toate experimentele de cinetică de legare au fost efectuate fie la 25°C, fie la 37°C. Constantele vitezei de asociere cinetică (k_a) și disociere (k_d) au fost determinate prin ajustarea senzogramelor în timp real la un model de legare 1:1 utilizând software-ul de ajustare a curbei Scrubber 2.0c. Constantele de echilibru de disociere de legare (K_D) și timpii de înjumătățire disociativ (t_{1/2}) au fost calculate din constantele vitezei cinetice ca: $K_D (M) = k_d/k_a$ și $t_{1/2} (min) = \ln 2 / (60 \times k_d)$.

Parametrii cinetici de legare pentru legarea C5 umană la anticorpii anti-C5 la 25°C și 37°C sunt prezentați în tabelele 3 și 4.

Tabelul 3: Parametrii cineticii de legare ai anticorpilor monoclonali anti-C5 care se leagă de C5 uman la 25°C

Anticorp	Cantitate de anticorp capturat (RU)	100nM uman C5 Legat (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H11683N	231	439	4.17E+05	5.14E-05	1.23E-10	225
H4H12171P	51	64	1.49E+05	8.16E-05	5.49E-10	142
H4H12161P	38	64	2.58E+05	4.37E-05	1.70E-10	264
H4H12176P2	50	96	3.36E+05	6.75E-05	2.01E-10	171
H4H12163P	51	108	6.43E+05	2.08E-04	3.24E-10	55
H4H 12167P	52	116	1.09E+06	1.31E-04	1.21E-10	88
H4H12175P	51	100	2.16E+05	1.96E-04	9.10E-10	59
H4H12159P	53	118	9.75E+05	7.13E-05	7.31E-11	162
H4H12164P	52	103	2.92E+05	8.84E-05	3.02E-10	131
H4H12168P	50	113	4.23E+05	4.75E-05	1.12E-10	243
H4H12169P	51	18	2.24E+05	4.40E-04	1.96E-09	26
H4H11686N	200	341	2.20E+05	3.31E-05	1.50E-10	349
H4H12170P	51	119	5.25E+05	6.79E-05	1.29E-10	170
H4H12177P2	47	60	6.56E+04	6.29E-05	9.59E-10	184
H4H12183P2	46	50	1.66E+05	2.70E-05	1.63E-10	427
H4H12166P	53	105	6.42E+05	1.10E-04	1.71E-10	105
H4H12166P2	53	95	8.26E+05	3.61E-04	4.38E-10	32
H4H12166P3	59	124	4.03E+05	4.65E-04	1.15E-09	25
H4H12166P4	49	92	4.46E+05	1.76E-04	3.95E-10	66
H4H12166P5	59	110	2.85E+05	3.28E-04	1.15E-09	35
H4H12166P6	64	131	4.89E+05	1.84E-04	3.75E-10	63
H4H12166P7	50	92	2.74E+05	1.01E-03	3.67E-09	11
H4H12166P8	50	91	4.84E+05	6.86E-04	1.42E-09	17
H4H12166P9	52	100	3.32E+05	2.64E-04	7.94E-10	44
H4H12166P10	49	69	1.57E+05	1.32E-03	8.38E-09	9
Comparator 1	232	250	9.69E+04	1.46E-04	1.51E-09	79
Comparator 2	117	170	2.62E+05	2.39E-04	9.12E-10	48

Tabelul 4: Parametrii cineticii de legare ai anticorpilor monoclonali anti-C5 care se leagă de C5 uman la 37°C

Antibody	Amount of Antibody Captured (RU)	100nM Human C5 Bound (RU)	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
			(1/Ms)	(1/s)	(M)	(min)
H4H11683N	257	492	4.54E+05	2.41E-04	5.32E-10	48
H4H12171P	59	58	1.22E+05	7.62E-04	6.27E-09	15
H4H12161P	40	66	1.16E+05	1.15E-04	9.90E-10	101
H4H12176P2	38	71	1.47E+05	2.34E-04	1.59E-09	49
H4H12163P	65	139	9.11E+05	6.65E-04	7.29E-10	17
H4H12167P	75	153	1.29E+06	3.81E-04	2.95E-10	30
H4H12175P	74	132	2.96E+05	6.37E-04	2.15E-09	18
H4H12159P	70	145	1.04E+06	1.07E-04	1.03E-10	108
H4H12164P	66	140	3.96E+05	1.28E-04	3.23E-10	90
H4H12168P	34	12	2.50E+04	4.64E-04	1.85E-08	25
H4H12169P	59	65	1.15E+05	3.52E-04	3.06E-09	33
H4H11686N	206	406	3.33E+05	1.56E-04	4.69E-10	74
H4H12170P	34	55	2.97E+05	4.15E-04	1.40E-09	28
H4H12177P2	41	37	4.42E+04	5.78E-04	1.31E-08	20
H4H12183P2	29	30	4.30E+04	2.50E-04	5.81E-09	46
H4H12166P	69	127	8.80E+05	2.30E-04	2.62E-10	50
H4H12166P2	68	110	9.50E+05	1.23E-03	1.29E-09	9
H4H12166P3	86	147	6.12E+05	1.27E-03	2.07E-09	9
H4H12166P4	63	108	5.05E+05	4.69E-04	9.30E-10	25
H4H12166P5	76	129	4.40E+05	1.22E-03	2.77E-09	9
H4H12166P6	90	157	5.42E+05	4.74E-04	8.75E-10	24
H4H12166P7	64	105	3.49E+05	2.58E-03	7.39E-09	4
H4H12166P8	65	98	6.75E+05	2.09E-03	3.10E-09	6
H4H12166P9	76	122	3.75E+05	6.39E-04	1.70E-09	18
H4H12166P10	64	82	2.27E+05	3.14E-03	1.38E-08	4
Comparator 1	185	246	1.47E+05	5.30E-04	3.61E-09	22
Comparator 2	119	205	2.85E+05	6.57E-04	2.30E-10	18

Legarea C5-mmh de maimuță la anticorpilor anti-C5 la 25°C și 37°C este prezentată în tabelele 5 și 6.

Tabelul 5: Parametrii cineticii de legare ai anticorpilor monoclonali anti-C5 care se leagă de C5-mmh de maimuță la 25°C

Anticorp	Cantitate de anticorp capturat (RU)	100nM maimuță C5-mmh legat (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H11683N	228	403	3.86E+05	2.47E-04	6.40E-10	47
H4H12171P	51	17	4.60E+04	2.26E-04	4.92E-09	51
H4H12161P	38	45	6.33E+04	2.48E-05	3.92E-10	465
H4H12176P2	50	69	1.82E+05	5.88E-05	3.22E-10	196
H4H12163P	50	98	3.11E+05	7.75E-04	2.49E-09	15
H4H12167P	52	111	4.19E+05	1.32E-04	3.15E-10	88
H4H12175P	51	59	6.42E+04	1.65E-03	2.57E-08	7
H4H12159P	53	116	3.54E+05	4.69E-05	1.33E-10	246
Anticorp	Cantitate de anticorp capturat (RU)	100nM maimuță C5-mmh legat (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H12164P	51	66	1.27E+05	1.53E-03	1.20E-08	8
H4H12168P	50	86	1.73E+05	1.14E-04	6.60E-10	101
H4H12169P	51	22	1.64E+05	4.55E-03	2.78E-08	3
H4H11686N	196	247	1.57E+05	4.89E-04	3.11E-09	24
H4H12170P	51	92	2.62E+05	5.21E-05	1.99E-10	222
H4H12177P2	47	32	4.62E+04	9.92E-04	2.15E-08	12
H4H12183P2	47	23	4.88E+04	4.94E-04	1.01E-08	23
H4H12166P	52	90	2.05E+05	1.06E-03	5.15E-09	11
H4H12166P2	53	71	3.00E+05	3.16E-03	1.05E-08	4
H4H12166P3	59	72	1.68E+05	4.47E-03	2.66E-08	3
H4H12166P4	49	69	2.10E+05	1.78E-03	8.50E-09	6
H4H12166P5	59	56	1.44E+05	3.46E-03	2.40E-08	3
H4H12166P6	64	94	2.39E+05	2.66E-03	1.11E-08	4
H4H12166P7	50	36	1.36E+05	6.33E-03	4.65E-08	2
H4H12166P8	50	47	2.31E+05	4.99E-03	2.16E-08	2
H4H12166P9	52	55	1.70E+05	3.18E-03	1.87E-08	4
H4H12166P10	49	15	9.56E+04	6.16E-03	6.44E-08	2
Comparator 1*	228	11	N/A	N/A	3.11E-07	N/A

N/A= Nu este disponibil; *SS= analiza la starea de echilibru

Tabelul 6: Parametrii cineticii de legare ai anticorpilor monoclonali anti-C5 care se leagă de C5-mmh de maimuță la 37°C

Anticorp	Cantitate de anticorp capturat (RU)	100nM maimuță C5-mmh legat (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H11683N	192	303	5.35E+05	1.15E-03	2.16E-09	10
H4H12171P	59	78	5.56E+05	1.03E-03	1.85E-09	11
H4H12161P	41	53	1.34E+05	7.45E-04	5.56E-09	16
H4H12176P2	36	47	1.35E+05	1.29E-03	9.60E-09	9
H4H12163P	64	129	3.90E+05	1.25E-03	3.20E-09	9
H4H12167P	74	146	5.37E+05	2.89E-	5.39E-	40

				04	10	
H4H12175P	74	74	1.77E+05	2.76E-03	1.56E-08	4
H4H12159P	70	137	4.12E+05	5.50E-05	1.33E-10	210
H4H12164P	65	99	1.86E+05	1.17E-03	6.30E-09	10
H4H12168P	34	29	5.33E+04	6.76E-04	1.27E-08	17
H4H12169P	59	64	2.51E+05	3.61E-03	1.43E-08	3
H4H11686N	145	195	2.33E+05	2.07E-03	8.88E-09	6
H4H12170P	34	60	5.21E+05	8.71E-04	1.67E-09	13
H4H12177P2	41	27	1.50E+05	7.17E-03	4.77E-08	2
H4H12183P2	28	13	5.40E+04	6.37E-03	1.18E-07	2
H4H12166P	68	110	2.19E+05	1.87E-03	8.55E-09	6
H4H12166P2	68	83	3.93E+05	2.97E-03	7.56E-09	4
H4H12166P3	85	92	2.23E+05	2.92E-03	1.31E-08	4
H4H12166P4	62	80	2.23E+05	1.83E-03	8.20E-09	6
H4H12166P5	75	70	1.50E+05	3.13E-03	2.09E-08	4
H4H12166P6	90	112	2.53E+05	2.32E-03	9.18E-09	5
H4H12166P7	63	48	1.25E+05	2.41E-03	1.93E-08	5
H4H12166P8	64	53	2.03E+05	2.69E-03	1.33E-08	4
H4H12166P9	75	69	1.81E+05	2.61E-03	1.44E-08	4
H4H12166P10	63	24	6.60E+04	2.79E-03	4.22E-08	4
Comparator 1	132	4	NB	NB	NB	NB

Legarea C5 R885H-mmh umană și C5 R885C-mmh umană la anticorpii anti-C5 la 25°C sunt prezentate în Tabelele 7 și, respectiv, 8.

5 **Tabelul 7: Parametrii cineticii de legare ai anticorpilor monoclonali anti-C5 care se leagă de C5 R885H-mmh uman la 25°C**

Anticorp	Cantitate de anticorp capturat (RU)	100nM uman C5 R885H-mmh legat (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H11683N	183	118	5.26E+05	2.46E-04	4.68E-10	47
H4H12171P	119	51	6.59E+05	1.42E-04	2.16E-10	81
H4H12161P	105	199	8.36E+04	8.32E-05	9.96E-10	139
H4H12176P2	170	65	1.78E+05	2.17E-04	1.22E-09	53
H4H12163P	111	214	6.72E+05	4.34E-04	6.46E-10	27

				04	10	
H4H12167P	93	187	6.89E+05	2.98E-04	4.33E-10	39
H4H12175P	104	207	1.81E+05	1.98E-03	1.09E-08	6
H4H12159P	101	177	7.06E+05	1.76E-04	2.50E-10	66
H4H12164P	143	295	1.58E+05	1.87E-04	1.19E-09	62
H4H12168P	138	197	5.29E+04	2.14E-04	4.05E-09	54
H4H12169P	116	173	4.84E+05	7.09E-05	1.47E-10	163
H4H11686N	145	259	2.16E+05	1.06E-04	4.91E-10	109
H4H12170P	244	442	4.09E+05	1.61E-04	3.94E-10	72
H4H12177P2	137	232	1.48E+05	5.92E-04	4.01E-09	20
H4H12183P2	158	99	3.77E+04	4.37E-05	1.16E-09	264
H4H12166P	188	366	5.28E+05	2.12E-04	4.02E-10	54
Comparator 1	87	11	NB	NB	NB	NB
Comparator 2	118	249	1.08E+06	6.53E-04	6.06E-10	18

Tabelul 8: Parametrii cineticii de legare ai anticorpilor monoclonali anti-C5 care se leagă de C5 R885C-mmh uman la 25°C

Anticorp	Cantitate de anticorp capturat (RU)	100nM uman C5 R885C-mmh legat (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H11683N	174	116	4.99E+05	2.39E-04	4.79E-10	48
H4H12171P	109	51	3.79E+05	1.39E-04	3.66E-10	83
H4H12161P	103	147	1.30E+05	8.71E-05	6.72E-10	133
H4H12176P2	164	63	1.07E+05	2.18E-04	2.03E-09	53
H4H12163P	110	211	5.04E+05	4.32E-04	8.58E-10	27
H4H12167P	85	163	7.11E+05	2.94E-04	4.13E-10	39
H4H12175P	99	128	8.18E+04	1.55E-02	1.90E-07	1
H4H12159P	93	168	5.86E+05	1.69E-04	2.89E-10	68
H4H12164P	139	249	1.53E+05	1.82E-04	1.19E-09	63
H4H12168P	128	144	6.09E+04	1.99E-04	3.27E-09	58
H4H12169P	108	168	2.78E+05	6.99E-05	2.51E-10	165
H4H11686N	143	253	1.78E+05	9.49E-05	5.34E-10	122
H4H12170P	244	427	3.57E+05	1.60E-	4.47E-	72

				04	10	
H4H12177P2	138	177	1.00E+05	1.32E-03	1.32E-08	9
H4H12183P2	158	80	2.99E+04	2.20E-05	7.37E-10	525
H4H12166P	188	356	4.26E+05	2.07E-04	4.87E-10	56
Comparator 1	87	9	NB	NB	NB	NB
Comparator 2	117	241	1.17E+06	6.19E-04	5.30E-10	19

Legarea C5 R885H-mmh umană și C5 R885C-mmh umană la anticorpii anti-C5 la 37°C sunt prezentate în Tabelele 9 și, respectiv, 10.

Tabelul 9: Parametrii cineticii de legare ai anticorpilor monoclonali anti-C5 care se leagă de C5 R885H-mmh uman la 37°C

5

Anticorp	Cantitate de anticorp capturat (RU)	100nM uman C5 R885H-mmh legat (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H11683N	49	81	5.48E+05	1.47E-03	2.69E-09	8
H4H12171P	59	80	5.92E+05	9.63E-04	1.63E-09	12
H4H12161P	41	54	1.18E+05	9.25E-04	7.84E-09	12
H4H12176P2	45	69	2.57E+05	9.58E-04	3.73E-09	12
H4H12163P	60	85	7.24E+05	2.90E-03	4.00E-09	4
H4H12167P	38	65	8.81E+05	2.57E-03	2.91E-09	5
H4H12175P	25	30	1.37E+05	9.50E-03	6.94E-08	1
H4H12159P	51	82	6.38E+05	9.48E-04	1.49E-09	12
H4H 12164P	59	68	1.95E+05	1.06E-03	5.46E-09	11
H4H12168P	34	29	2.43E+04	1.23E-03	5.04E-08	9
H4H12169P	61	79	4.29E+05	7.39E-04	1.72E-09	16
H4H11686N	40	74	4.19E+05	8.00E-04	1.91E-09	14
H4H12170P	36	64	5.59E+05	8.39E-04	1.50E-09	14
H4H12177P2	45	51	2.76E+05	2.76E-03	1.00E-08	4
H4H12183P2	33	36	9.58E+04	7.12E-04	7.43E-09	16
H4H12166P	71	58	6.24E+05	1.31E-03	2.09E-09	9
Comparator 1	41	5	NB	NB	NB	NB
Comparator 2	23	47	8.39E+05	1.05E-03	1.25E-09	11

Tabelul 10: Parametrii cineticii de legare ai anticorpilor monoclonali anti-C5 care se leagă de C5 R885C-mmh uman la 37°C

Anticorp	Cantitate de anticorp capturat (RU)	100nM uman C5 R885C-mmh legat (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H11683N	48	78	4.38E+05	1.43E-03	3.25E-09	8
H4H12171P	59	78	4.77E+05	9.57E-04	2.01E-09	12
H4H12161P	41	49	1.10E+05	9.01E-04	8.17E-09	13
H4H12176P2	44	55	1.41E+05	1.03E-03	7.32E-09	11
H4H12163P	59	83	5.66E+05	2.81E-03	4.97E-09	4
H4H12167P	38	64	6.84E+05	2.49E-03	3.64E-09	5
H4H12175P	25	4	1.12E+05	1.79E-02	1.59E-07	1
H4H12159P	51	68	5.61E+05	9.75E-04	1.74E-09	12
H4H 12164P	59	64	1.77E+05	1.04E-03	5.85E-09	11
H4H12168P	34	21	6.38E+04	5.69E-04	8.90E-09	20
H4H12169P	61	75	3.29E+05	7.37E-04	2.24E-09	16
H4H11686N	39	69	2.84E+05	7.91E-04	2.78E-09	15
H4H12170P	36	61	4.24E+05	8.70E-04	2.05E-09	13
H4H12177P2	43	31	1.07E+05	5.07E-03	4.76E-08	2
H4H12183P2	31	25	5.12E+04	9.97E-04	1.95E-08	12
H4H12166P	72	54	4.91E+05	1.26E-03	2.56E-09	9
Comparator 1	41	2	NB	NB	NB	NB
Comparator 2	23	42	7.34E+05	1.07E-03	1.45E-09	11

- 5 La 25°C, toți cei 25 de anticorpi anti-C5 ai invenției și anticorpul anti-C5 dezvăluit aici s-au legat la C5 uman cu valori K_D variind de la 73 pM la 8,4 nM, așa cum se arată în Tabelul 3. La 37°C, anticorpii anti-C5 ai invenției și anticorpul anti-C5 dezvăluit aici s-au legat la C5 uman cu valori K_D variind de la 103 pM la 18,5 nM, așa cum se arată în Tabelul 4. La 25°C, 25 din cei 25 de anticorpi anti-C5 ai invenției și anticorpi anti-C5 dezvăluit aici au fost testați legați la maimuță C5-mmh cu valori K_D variind de la 133 pM la 64 nM, așa cum se arată în Tabelul 5. La 37°C, 25 din cei 25 de anticorpi anti-C5 ai invenției și anticorpi anti-C5 dezvăluit aici au fost testați legați de C5-mmh de maimuță cu valori K_D variind de la 133 pM la 118 nM, așa cum se arată în Tabelul 6. La 25°C, 16 din cei 16 anticorpi anti-C5 ai invenției și anticorpi anti-C5 dezvăluit aici au fost testați legați de C5 R885H-mmh uman cu valori K_D variind de la 147 pM la 10,9 nM așa cum se arată în Tabelul 7. La 25°C, 16 dintre cei 16 anticorpi anti-C5 ai invenției și anticorpi anti-C5 dezvăluit aici au fost testați legați de C5 R885C-mmh uman cu valori K_D variind de la 251 pM la 190 nM, așa cum se arată în Tabelul 8. La 37°C, 16 din cei 16 anticorpi anti-C5 ai invenției și anticorpi anti-C5 dezvăluit aici au fost testați legați de C5 R885H-mmh uman cu valori K_D variind de la 1,49 nM la 69,4 nM așa cum se arată în Tabelul 9. La 25°C, 16 din cei 16 anticorpi anti-C5 ai invenției și anticorpi anti-C5 dezvăluit aici au fost testați legați de C5 R885C-mmh uman cu valori K_D variind de la 1,74 nM la 159 nM, așa cum se arată în Tabelul 10.

Exemplul 4: Anticorpul se leagă la C5 prin pH diferit

Efectul pH-ului asupra vitezei de disociere a C5 uman recombinant legat de anticorpi monoclonali anti-C5 purificați a fost determinat utilizând un biosenzor de rezonanță plasmonică de suprafață în timp real folosind un instrument Biacore T200.

Suprafața senzorului Biacore a fost mai întâi derivatizată prin cuplarea amină cu un anticorp monoclonal de șoarece anti-Fc uman (GE, # BR-1008-39) pentru a captura anticorpi monoclonali anti-C5 exprimați cu IgG4 Fc uman. Toate studiile de legare Biacore au fost efectuate utilizând două soluții tampon de rulare PBS-T, pH 7,4 (0,01 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0,15 M NaCl, 0,05% v/v Tween-20, ajustat la pH-ul PBS-T4) și PBS-T4. 0 (0,01 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0,15 M NaCl, 0,05% v/v Tween-20, ajustat la pH 6,0). Diferite concentrații de C5 uman (EMD, Catalog # 204888) sau C5.mmh de maimuță (preparat în tampon de rulare PBS-T, pH 7,4 (cuprinzând de la 100 nM la 11,11 nM, diluții de trei ori) au fost injectate peste monoclonal anti-C5 suprafața capturată a anticorpului timp de 3 minute la un debit de 50 μL/minut și disocierea lor în două soluții tampon de rulare PBS-T, pH7,4 și PBS-T, pH6,0 a fost monitorizată timp de 6 minute. Toate experimentele de cinetică de legare au fost efectuate la 25°C și 37°C. Constantele de disociere cinetică (k_d) au fost determinate prin ajustarea senzogramelor în timp real la un model de legare 1:1 utilizând software-ul de ajustare a curbei Scrubber 2.0c. Timpurile de înjumătățire disociativă de legare (t_{1/2}) au fost calculate din k_d ca:

$$t_{1/2} \text{ (min)} = \frac{\ln(2)}{k_d} = 60 * k_d$$

Rapoartele timpului de înjumătățire pentru legarea C5 umană la diferiți anticorpi monoclonali anti-C5 la 25°C și 37°C în două tampon de rulare PBS-T, pH7,4 și PBS-T, pH6,0 sunt prezentate în Tabelele 11 și 12.

Tabelul 11: Raportul timpului de înjumătățire al anticorpilor anti-C5 selectați pentru C5 uman la 25°C

mAb Capturat	t _{1/2} Raport pH7.4 /pH6.0
H4H12169P	IC
H4H12176P2	IC
H4H12161P	IC
H4H12159P	≤ 0.3
H4H12170P	≤ 0.5
H4H12166P	4.5
H4H12183P2	IC
H4H12167P	0.6
H4H12164P	0.3
H4H12163P	1.2
H4H12175P	0.9
H4H12177P2	≤ 0.5
H4H12171P	0.6
H4H12168P	1.5
H4H12166P2	9.3
H4H12166P3	7.9
H4H12166P4	7.8
H4H12166P5	8.3
H4H12166P6	7.8
H4H12166P7	35
H4H12166P8	47
H4H12166P9	31
mAb Capturat	t _{1/2} Raport pH7.4 /pH6.0
H4H12166P1 0	33
H4H11683N	2
H4H11686N	2
IC = neconcludente	

Tabelul 12: Raportul timpului de înjumătățire al anticorpilor anti-C5 selectați pe C5 uman la 37°C

mAb Capturat	$t_{1/2}$ Raport pH7.4/pH6.0
H4H12169P	IC
H4H12176P2	≤ 0.4
H4H12161P	≤ 0.7
H4H12159P	≤ 0.2
H4H12170P	≤ 0.2
H4H12166P	3.8
H4H12183P2	IC
H4H12167P	0.2
H4H12164P	≤ 0.1
H4H12163P	0.8
H4H12175P	0.9
H4H12177P2	1.3
H4H12171P	3.7
H4H12168P	1
H4H12166P2	7.3
H4H12166P3	6.6
H4H12166P4	7.6
H4H12166P5	7.6
H4H12166P6	8.2
H4H12166P7	21
H4H12166P8	36
H4H12166P9	28
H4H12166P10	19
H4H11683N	1.4
H4H11686N	0.8
IC = neconcludent	

5 Rapoartele timpului de înjumătățire pentru legarea C5 de maimuță la diferiți anticorpi monoclonali anti-C5 la 25°C și 37°C în două tampon de rulare PBS-T, pH7,4 și PBS-T, pH6,0 sunt prezentate în Tabelele 13 și 14.

Tabelul 13: Raportul timpului de înjumătățire al anticorpilor anti-C5 selectați pe C5 de maimuță la 25°C

mAb Capturat	$t_{1/2}$ Raport pH7.4/pH6.0
H4H12169P	3.4
H4H12176P2	≥ 9.1
H4H12161P	IC
H4H12159P	1.2
H4H12170P	≥ 1.7
H4H12166P	18.5
H4H12183P2	5.8
H4H12167P	9.2
H4H12164P	2.9
H4H12163P	9.7
H4H12175P	3.6
H4H12177P2	3.7
H4H12171P	2.1
H4H12168P	3.8
H4H11683N	0.34
H4H11686N	0.37
IC = neconcludente	

Tabelul 14: Raportul timpului de înjumătățire al anticorpilor anti-C5 selectați pe C5 de maimuță la 37°C

mAb Capturat	t_{1/2} Raport pH7.4/pH6.0
H4H12169P	2
H4H12176P2	2.8
H4H12161P	10.7
H4H12159P	6.3
H4H12170P	4.7
H4H12166P	7.1
H4H12183P2	2.4
H4H12167P	4.4
H4H12164P	1.1
H4H12163P	3.3
H4H12175P	0.4
H4H12177P2	1.5
H4H12171P	4.7
H4H12168P	4
H4H11683N	0.7
H4H11686N	0.5
IC = neconcludente	

După cum se arată în Tabelele 11 - 14, anticorpilor anti-C5 selectați au prezentat legare dependentă de pH, așa cum se vede prin rapoartele t_{1/2}.

Exemplul 5: Competiție încrucișată cu octeți între anticorpilor anti-C5

Competiția de legare între anticorpilor monoclonali anti-C5 (mAbs) a fost determinată utilizând un test de interferometrie cu bio-strat în timp real, fără etichete, pe un biosenzor Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.). Întregul experiment a fost efectuat la 25°C în 0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,05% v/v Surfactant Tween-20, 0,1 mg/mL BSA (tampon Octet HBS-P) cu placa agitându-se la viteza de 1000 rpm. Pentru a evalua dacă 2 anticorpi au fost capabili să concureze unul cu altul pentru legarea la epitopii lor respectivi pe un C5 uman (hC5 purificat din plasmă, EMD), aproximativ 1,5 nm de mAb C5 anti-uman au fost capturați mai întâi pe Octet acoperit cu anticorp anti-hFc. Vârfuri de biosenzor (Pall ForteBio Corp., # 18-5060) prin scufundarea vârfurilor timp de 3 minute în godeuri care conțin o soluție de 50 pg/mL de mAb C5 anti-uman (denumit ulterior mAb1). Vârfurile biosenzorului capturate cu anticorpi au fost apoi saturate cu un mAb de control al izotipului H4H blocant (denumit ulterior mAb blocant) prin scufundare în godeuri care conțin 200 pg/mL soluție de mAb blocant timp de 4 minute. Vârfurile biosenzorului au fost apoi scufundate în godeuri care conțineau o soluție co-complexată de 50 nM hC5 și 1 pM dintr-un al doilea mAb C5 anti-uman (denumit ulterior mAb2), care a fost preincubat timp de 2 ore, timp de 4 minute. Vârfurile biosenzorului au fost spălate în tampon Octet HBS-P între fiecare etapă a experimentului. Răspunsul de legare în timp real a fost monitorizat pe parcursul experimentului și a fost înregistrat răspunsul de legare la sfârșitul fiecărei etape. Răspunsul legării mAb2 pre-complexat uman C5 la mAb1 a fost corectat pentru legarea de fond, a fost comparat și comportamentul competitiv/necompetitiv al diferiților anticorpi monoclonali anti-C5.

Tabelul 15 definește în mod explicit relațiile anticorpilor care concurează în ambele direcții, independent de ordinea legării.

Tabelul 15: Competiția încrucișată între perechile de anticorpi anti-C5 selectați

Primul mAb (mAb1) capturat folosind biosenzori AHC Octet	Anticorpilor mAb2 dovedit a concura cu mAb1
H4H12183P2	H4H12167P; H4H12166P; H4H12163P
H4H12167P	H4H12183P2; H4H12166P; H4H12163P
H4H12166P	H4H12183P2; H4H12167P; H4H12163P
H4H12163P	H4H12183P2; H4H12167P; H4H12166P
H4H12159P	H4H12169P; H4H11683N; H4H12170P
H4H12169P	H4H12159P; H4H11683N; H4H12170P
H4H11683N	H4H12159P; H4H12169P; H4H12170P
H4H12170P	H4H12159P; H4H12169P; H4H11683N
H4H12175P	H4H12177P2
H4H12177P2	H4H12175P
H4H12176P2	H4H12164P

H4H12164P	H4H12176P2
H4H12168P	nici unul
H4H12161P	nici unul
H4H11686N	nici unul

Exemplul 6: Inhibarea citotoxicității dependente de complement mediată de CS într-un biotest de celule B

Acest exemplu descrie o analiză biologică pentru a testa rolul C5 utilizând un anticorp anti-CD20 în calea clasică a complementului. S-a demonstrat că anticorpii anti-CD20 terapeuți împotriva antigenului CD20 de suprafață celulară specific celulei B conduc la CDC ale celulelor B (Glennie și colab. 2007, Mol. Immunol. 44: 3823-3837) și testul CDC folosind linii celulare care exprimă CD20 a fost descris anterior (Flieger și colab. 2000, Cell. Immunol. 204: 55-63). Celulele Daudi, o linie de celule B umane care exprimă CD20, completează serul conservat sau serul epuizat în C5 cu variante exogene C5 și un anticorp anti-CD20 (anticorp care cuprinde VH/VL din „2F2” din brevetul US 8,529,902) au fost utilizate pentru a evalua rolul Activitatea C5 în CDC.

Pentru biotestul C5 CDC, celulele Daudi au fost însemănțate pe plăci de analiză cu 96 de godeuri la 10.000 celule/godeu fie în RPMI care conține 10% FBS, penicilină/streptomycină, L-glutamină, piruvat de sodiu și aminoacizi neesențiali (media completă RPMI) sau RPMI care conține 1% BSA, penicilină/streptomycină și L-glutamina (RPMI/BSA). Toate testele de testare a anticorpilor anti-hC5 mutați, împreună cu testarea anticorpilor nemutați cu C5 care conține ser uman au fost testate în mediu RPMI Complete, în timp ce testele de testare a anticorpilor nemutați cu ser de maimuță verde africană și variante umane C5 au fost testate în media RPMI/BSA. Pentru a măsura CDC cu ser uman sau de maimuță, anticorpul anti-CD20 a fost diluat 1:3 de la 100 nM la 2 pM (inclusiv o probă martor care nu conține anticorp) și incubat cu celule timp de 10 minute la 25°C, urmat de adăugarea de ser 1,66% sau 1,66% din serul epuizat în C5 și proteinele variante C5 6,6 nM. Cantitatea de proteină C5 care trebuie adăugată la serul epuizat C5 s-a bazat pe valoarea raportată a concentrației C5 în serul uman de 0,37 uM (Rawal și colab. 2008, J. Biol. Chim. 283: 7853-7863). Pentru a testa inhibarea CDC cu anticorpi C5, anticorpii C5 au fost diluați 1:3 de la 100 nM la 2 pM (inclusiv o probă de control care nu conține anticorpi) și incubati cu 1,66% ser sau 1,66% din ser C5 epuizat și 6,6 nM proteine variante C5 timp de 30 de minute. Zece minute înainte de adăugarea anticorpilor cu ser la celule, anticorpul anti-CD20 a fost adăugat la celule la 1 nM, 2 nM, 3 nM, 3,5 nM, 7 nM, 10 nM sau 30 nM. La încheierea incubării cu anticorpul anti-CD20, amestecul anticorp/ser a fost adăugat la celule. Citotoxicitatea a fost măsurată după 3,5 ore de incubare la 37 °C și în CO₂ 5%, urmată de incubare de 15 minute la 25 °C și adăugare de reactiv CytoTox-Glo™ (Promega, # G9292). CytoTox-Glo™ este un reactiv pe bază de luminiscență care măsoară distrugerea celulelor astfel încât luminiscența crescută este observată cu citotoxicitate crescută (măsurată în unități de lumină relative, RLU).

Celulele netratate din godeurile de control au fost lizate prin tratament cu digitonină imediat după adăugarea reactivului CytoTox-Glo™ pentru a determina distrugerea maximă a celulelor. Plăcile au fost citite pentru luminiscență cu un instrument Victor X (Perkin Elmer) la 15 minute după adăugarea CytoTox-Glo™. Acolo unde a fost calculat, procentul de citotoxicitate a fost calculat cu valorile RLU folosind următoarea ecuație:

$$\% \text{ Citotoxicitate} = 100 \leftrightarrow \frac{\text{Liza celulară experimentală} - \text{Liza celulară de fond}}{\text{Liza celulară maximă} - \text{Liza celulară de fond}}$$

În această ecuație, „liza celulelor de fond” este luminescența celulelor tratate cu mediu și ser singur, fără niciun anticorp anti-CD20, iar „liza celulară maximă” este luminescența celulelor tratate cu digitonină. Rezultatele, exprimate ca % de citotoxicitate sau RLU, au fost analizate folosind regresia neliniară (logistica cu 4 parametri) cu software-ul Prism 5 (GraphPad) pentru a obține valorile EC₅₀ și IC₅₀. Inhibarea anticorpilor a fost calculată astfel încât inhibarea 0 - 100% este intervalul de inhibare a concentrației de anticorp anti-CD20 utilizat în testul fără inhibitor la anticorpul anti-CD20 0nM.

Rezultate

Un total de 25 de anticorpi anti-umani C5, 16 nemutați și 9 mutați, au fost testați pentru capacitatea lor de a inhiba C5 în testul CDC folosind celule Daudi cu un anticorp anti-CD20 și fie seruri umane (cu variante hC5 normale sau C5) sau serurile de maimuță verde africană. Diverse reziduuri din regiunile determinate complementare (CDR) ale H4H12166P au fost mutate în histidine pentru a genera 9 anticorpi mutați, H4H12166P2-H4H12166P10. S-a demonstrat că mutațiile histidinei din CDR-uri conferă o dependență de pH a legării la antigenul țintă, ceea ce duce la o farmacocinetică îmbunătățită (Igawa și colab. 2010, Nat. Biotechnol. 28: 1203-1207).

Tabelul 16: Inhibarea nemutată a anticorpilor anti-hC5 a CDC cu 1,66% ser și anticorp anti-CD20 în celulele Daudi

Serum	Uman	Uman	Maimăță verde africană	C5 săracit uman și 6.6nM C5 Varianta R885H	C5 săracit uman și 6.6nM C5 Varianta R885C
EC50 [M] anticorp anti-CD20 (cu 1.66% Serum)	1.0E-09	1.4E-09	2.4E-09	1.9E-09	2.7E-09
Anticorp anti- CD20 constant (cu 1.66% serum)	1nM		3nM	3.5nM	30nM
Anticorp	IC50 [M]		IC50 [M] (% Inhibiție maximă)*	IC50 [M]	IC50 [M] (% Inhibiție maximă)*
H4H11683N	Netestat	1.2E-09	4.0E-09	1.3E-09	9.0E-10
H4H11686N	Netestat	1.5E-09	4.4E-09	1.1E-09	4.5E-10
H4H12159P	3.2E-09	Netestat	3.4E-09	1.4E-09	1.0E-09
H4H12161P	2.4E-09	Netestat	2.6E-09	1.8E-09	1.0E-09
H4H12163P	3.4E-09	Netestat	3.7E-09	2.1E-09	1.1E-09
H4H12164P	2.4E-09	Netestat	5.8E-09	1.8E-09	8.2E-10
H4H12166P	2.6E-09	Netestat	4.5E-09	1.3E-09	4.6E-10
H4H12167P	2.5E-09	Netestat	3.5E-09	1.9E-09	1.0E-09
H4H12168P	1.5E-09	Netestat	2.0E-09	2.3E-09	8.6E-10
H4H12169P	1.7E-09	Netestat	2.9E-09	1.3E-09	6.7E-10
H4H12170P	2.0E-09	Netestat	3.7E-09	4.8E-10	4.3E-10
H4H12171P	1.9E-09	Netestat	3.3E-09	1.6E-09	6.5E-10
H4H12175P	2.2E-09	Netestat	5.2E-09	4.2E-09	>2.0E-08 (67%)
H4H12176P2	2.7E-09	Netestat	3.5E-09	2.1E-09	1.3E-09
H4H12177P2	2.2E-09	Netestat	6.1E-09	2.4E-09	1.6E-09
H4H12183P2	1.7E-09	Netestat	1.4E-08	1.2E-09	4.5E-10
Comparator 1	2.3E-09	1.8E-09	>9.0E-08 (49%)	Fără inhibiție	Fără inhibiție
Control mAb 1	Fără inhibiție	Fără inhibiție	Netestat	Netestat	Netestat
Control mAb 2	Netestat	Netestat	Fără inhibiție	Fără inhibiție	Fără inhibiție
*Dacă nu se specifică altfel, toată inhibiția este de -100%					

5 După cum se arată în Tabelele 16 și 17, toți cei 25 de anticorpi anti-hC5 au prezentat inhibarea completă a CDC mediată de C5 prezent în 1,66% din serul uman. IC50-urile anticorpilor nemutați au variat de la 1,2 la 3,4 nM. IC50-urile anticorpilor mutați au variat de la 3,0 nM la 12 nM. Anticorpul parental, nemutat H4H12166P a dat o inhibare completă cu IC50 de 2,6 nM și 2,9 nM.

Tabelul 17: Inhibarea anticorpilor anti-hC5 mutați ai CDC cu 1,66% ser și anticorpi anti-CD20 în celulele Daudi

Serum	Uman	Maimuță verde africană	C5 săracit uman și 6,6 nM Varianta C5 R885H	C5 săracit uman și 6,6 nM C5 Varianta R885C
EC50 [M] de anticorp anti-CD20 (cu 1.66% Serum)	1.9E-09	2.6E-09	6.3E-09	9.5E-09
Anticorp anti-CD20 constant (cu 1.66% serum)	2nM	10nM	7nM	30nM
Anticorp	IC50 [M]	IC50 [M] (Inhibiție Maximă %) *	IC50 [M]	IC50 [M]
H4H12166P	2.9E-09	5.6E-09	1.3E-09	7.6E-10
H4H12166P2	3.7E-09	9.7E-09	1.7E-09	1.2E-09

H4H12166P3	7.8E-09	>3.0E-08 (64%)	2.9E-09	1.7E-09
H4H12166P4	3.5E-09	7.9E-09	1.5E-09	9.6E-10
H4H12166P5	4.9E-09	>3.0E-08 (75%)	2.1E-09	1.4E-09
H4H12166P6	3.0E-09	9.9E-09	1.3E-09	7.9E-10
H4H12166P7	7.3E-09	>6.0E-08 (61%)	4.2E-09	2.3E-09
H4H12166P8	4.1E-09	>2.0E-08 (79%)	2.1E-09	1.2E-09
H4H12166P9	3.9E-09	>1.0E-08 (85%)	1.7E-09	7.7E-10
H4H12166P10	1.2E-08	>1.0E-07 (34%)	7.0E-09	3.5E-09
Comparator 1	2.7E-09	>1.0E-07 (35%)	Fără inhibiție	Fără inhibiție
Control mAb 2	Fără inhibiție	Fără inhibiție	Fără inhibiție	Fără inhibiție
*Dacă nu se specifică altfel, toată inhibiția este de -100%				

Cei șaisprezece anticorpi anti-hC5 nemutați au arătat inhibarea completă a CDC mediată de maimuța verde africană C5 cu IC50 variind de la 2,0 nM la 14 nM.

Patru dintre cei 9 anticorpi mutați au prezentat inhibarea completă a CDC mediată de maimuța verde africană C5 cu IC50 variind de la 7,1 nM la 9,9 nM. Restul de șase anticorpi mutați au fost blocați cu IC50 mai mari de 10 nM și inhibarea maximă (la anticorpi 100 nM) variind de la 34% la 85%. Anticorpul parental, nemutat H4H12166P a dat inhibare completă cu IC50 de 4,5 nM și 5,6 nM.

Pentru a testa dacă anticorpul anti-hC5 inhibă variantele umane C5, R885H și R885C, ser uman sărăcit în C5 a fost testat cu 6,6 nM din fiecare variantă C5. Toți cei 25 de anticorpi anti-hC5 au arătat inhibarea completă a CDC mediată de varianta C5 R885H, cu IC50 ale anticorpilor nemutați variind de la 0,48 nM la 4,2 nM, în timp ce IC50 ale anticorpilor mutați variază de la 1,3 nM la 7,0 nM. Anticorpul parental, nemutat H4H12166P a dat inhibare completă cu IC50 de 1,3 nM și 1,3 nM.

Cincisprezece din 16 anticorpi anti-hC5 nemutați au arătat inhibarea completă a CDC mediată de varianta CS R885C cu IC50 variind de la 0,43 nM la 1,6 nM. Un anticorp nemutat a arătat o inhibare slabă a CDC cu o inhibare maximă de 67% (la anticorp de 100 nM) și un IC50 > 20 nM. Toți cei nouă anticorpi mutați au arătat inhibarea completă a CDC mediată de varianta CS R885C cu IC50 variind de la 0,77 nM la 3,5 nM. Anticorpul parental, nemutat H4H12166P a dat o inhibare completă cu un IC50 de 0,46 nM și 0,76 nM.

Anticorpul anti-CD20 a arătat CDC de celule Daudi cu 1,66% ser cu EC50 de 1,0 nM, 1,4 nM și 1,9 nM pentru ser uman, 2,4 nM și 2,6 nM pentru serul de maimuță verde africană, 1,9 nM și 6,3 nM pentru serul deplet cu hC5 Varianta de hC5 R885H și 2,7 nM și 9,5 nM pentru serul epuizat de hC5 cu varianta de hC5 R885C. Niciunul dintre anticorpul de control IgG irelevanți, Control mAb1 și Control mAb2, nu a demonstrat vreo inhibare a CDC.

Exemplul 7: Inhibarea activității C5a determinată prin testul luciferazei

Acest exemplu descrie un test pentru a testa activarea C5a prin unul dintre receptorii săi, C5aR1. C5aR1 este un receptor cuplat cu proteina G (GPCR) și poate iniția diferite căi de semnalizare cuplate cu GPCR (Monk și colab. 2007, Br. J. Pharmacol. 152: 429-448). Un biotest a fost stabilit utilizând celule HEK293 transfectate stabil cu C5aR1 uman (Nr. de acces NP_001727.1) și Ga16 uman (Nr. de acces NP_002059.3) împreună cu un reporter de luciferază [element de răspuns NFAT (4X)-luciferaza]. Ga16 este o proteină G relativ promiscuă care se poate cupla la diferite tipuri de GPCR, ducând la activarea PLC-β și la creșterea ulterioară a Ca⁺⁺, care, la rândul său, activează translocarea NFAT și transcripția genei reporter (Kostenis și colab. 2005, Trends Pharmacol. Sci. 26: 595-602). Linia celulară rezultată, HEK293/hGa16/hC5aR1/NFAT-luc, a fost izolată și menținută în 10% DMEM conținând 10% FBS, NEAA, penicilină/streptomicina, 500 μg/mL G418, 100 μg/mL higromicină/mL și blasticidină/mL.

Pentru biotestul cu luciferaza C5a, celulele HEK293/hGa16/hC5aR1/NFAT-luc au fost înșămânțate în plăci de analiză cu 96 de godeuri la 20.000 celule/godeu în OPTIMEM (Invitrogen, #31985-070) suplimentat cu 0,5% BSA streptomicină/godeu și L-glutamină și apoi incubate la 37°C și 5% CO₂ peste noapte. BSA a fost folosit în loc de FBS, deoarece s-a demonstrat că serul scindează și inactivează hC5a (Klos și colab., 2013, Pharmacol. Rev. 65: 500-543). În dimineața următoare, hC5a a fost titrat de la 100 nM la 2 pM (inclusiv o probă martor care nu conține hC5a) și adăugat la celule pentru a determina curba de titrare a răspunsului la doză pentru linia celulară. Pentru a testa inhibarea anticorpului hC5a a hC5a, 500 pM de hC5a au fost adăugate celulelor. Imediat după aceea, anticorpul diluat 1:3 de la 100 nM

la 2 pM (inclusiv o probă de control care nu conține anticorpi) au fost adăugați la celule. Celulele au fost incubate timp de 5,5 ore la 37°C în prezența a 5% CO₂. Activitatea luciferazei a fost detectată după incubarea cu reactiv OneGlo™ (Promega, #E6051). OneGlo™ este un reactiv pe bază de luminiscentă care măsoară cantitatea de luciferază prezentă în celule. În acest test, activarea crescută a hC5a duce la creșterea producției de luciferază și a luminiscentei (măsurate în unități de lumină relative, RLU). Măsurarea luminiscentei a fost efectuată folosind un instrument Victor X (Perkin Elmer). Rezultatele au fost analizate folosind regresia neliniară (logistica cu 4 parametri) cu software-ul Prism 5 (GraphPad) pentru a obține valorile EC₅₀ și IC₅₀. Inhibarea anticorpilor a fost calculată astfel încât inhibarea 0 - 100% este intervalul de inhibare de la 500 pM hC5a fără inhibitor la 0 nM hC5a.

Patru anticorpi anti-hC5 au fost testați pentru capacitatea lor de a inhiba activarea hC5a a receptorului său, hC5aR1, prin măsurarea gradului de inhibare a activării hC5a 500pM a celulelor HEK293/hGa16/hC5aR1/NFAT-luc.

Tabelul 18: Inhibarea anticorpului anti-hC5 a 500pM hC5a în celulele HEK293/Gα16/hC5aR1/NFAT-luc

EC ₅₀ [M] hC5a	3.9E-10
mAb PID or REGN #	Inhibiția a 500pM hC5a
	IC ₅₀ [M]
H2aM11682N	4.6E-10
H2aM11684N	3.5E-11
H2aM11694N	1.4E-10
H2aM11695N	4.2E-11
Control mAb	Fără inhibiție

După cum se arată în Tabelul 18, patru anticorpi au arătat inhibarea completă a 500 pM hC5a cu IC₅₀ variind de la 0,035 nM la 0,46 nM. Un anticorp de control IgG irelevant, Control mAb3, nu a demonstrat nicio inhibare a hC5a. hC5a a activat celule HEK293/Gα16/hC5aR1/NFAT-luc cu un EC₅₀ de 0,39 nM.

Exemplul 8: Biotestul de hemoliză

Testul de hemoliză a căii clasice (CH) și testul de hemoliză a căii alternative (AH) au fost dezvoltate pentru a testa activitatea anticorpului.

CH este un test de screening pentru activarea căii clasice a complementului, care este sensibilă la scăderea, absența și/sau inactivitatea oricărei componente a căii. CH testează capacitatea funcțională a componentelor complementului seric din calea clasică de lizare a globulelor roșii de oaie (SRBC) pre-acoperite cu anticorp de iepure anti-eritrocite de oaie (hemolizină). Când SRBC acoperite cu anticorpi sunt incubate cu ser de testare, calea clasică a complementului este activată și rezultă hemoliză. Dacă o componentă a complementului este absentă, nivelul CH va fi zero; dacă una sau mai multe componente ale căii clasice sunt scăzute, CH va fi scăzut. (Nilsson și colab. 1984, J. Immunol. Meth. 72: 49-59). Acest test este utilizat pentru caracterizarea și screeningul anticorpilor anti-umani C5 cu afinitate ridicată.

Metode

(A) Testul clasic de hemoliză a complementului căii

Numărul dorit de eritrocite de oaie (SRBC) a fost spălat în tampon GVB++ și re-suspendat la 1 x 10⁹ celule/mL. Pentru a sensibiliza SRBC, au fost amestecate cu un volum egal de hemolizină anti-oaie de iepure diluată 1:50 (1,5 mg/mL) la 37 °C timp de 20 de minute. Celulele SRBC sensibilizate au fost diluate la 2 x 10⁸ celule/ml în GVB++ înainte de a fi utilizate în testul de hemoliză. Ser uman normal sau ser de maimuță cynomolgus a fost diluat la 2% sau 10% în tampon GVB++. Pentru a testa inhibarea activității hemolizei mediate de C5, anticorpii de testare au fost pre-incubați timp de 20 de minute la 4°C, la concentrații cuprinse între 0,6 nM și 800 nM în ser uman normal 2% -10% sau 10% ser de maimuță cynomolgus sau maimuță verde africană. ser. Plăci cu 96 de godeuri cu fund rotund au fost utilizate pentru a măsura activitatea de hemoliză. Un total de 100 ul de RBC de oaie sensibilizate (2 x 10⁸ celule/ml) au fost plasate pe o placă cu 96 de godeuri, urmată de adăugarea a 100 ul de probe de ser respective care au fost pre-incubate cu anticorpii de testare. Celulele au fost amestecate ușor și incubate la 37°C timp de 60 de minute. După timpul de incubare, celulele au fost centrifugate prin centrifugare la 1250xg la 4°C. Un total de 100 uL de supernatant a fost transferat pe o placă proaspătă cu fund plat de 96 și citit la 412 nm pe cititorul de microplăci Spectramax. Activitatea hemolitică a fost calculată la concentrația serică finală de 1-5% pentru tratamente.

Procentul de hemoliză a fost calculat după cum urmează:

$$\% \text{ Hemoliza} = 100 \leftrightarrow \frac{\text{Liza celulară experimentală} - \text{Liza celulară de fond}}{\text{Liza celulară maximă} - \text{Liza celulară de fond}}$$

În această ecuație, „liza celulelor de fond” este OD la A412nm din celulele incubate în tampon GVB++ care nu conține doar ser. „Liza celulară maximă” este OD la A412nm din celulele tratate cu apă. Rezultatele, exprimate ca % hemoliză, au fost analizate utilizând regresia neliniară (logistica cu 4 parametri) cu software-ul Prism 5 (GraphPad) pentru a obține valorile IC₅₀. Datele reprezentate ca medie ± Eroarea standard a mediei

(B) Test alternativ al complementului

Numărul dorit de globule roșii de iepure (RbRBC) a fost spălat în tampon GVB-Mg²⁺/EGTA și re-suspendat la 2×10^8 celule/ml. Ser uman normal sau ser de maimuță cynomolgus a fost diluat la 10% în tampon GVB-Mg²⁺/EGTA. Pentru a testa inhibarea activității hemolizei mediate de C5, anticorpilor la concentrații cuprinse între 3 nM și 800 nM au fost pre-incubați timp de 20 de minute la 4°C în ser uman normal 5-10% sau ser de maimuță cynomolgus. Plăci cu 96 de godeuri cu fund rotund au fost utilizate pentru a măsura activitatea de hemoliză. Un total de 100 ul RbRBC (2×10^8 celule/ml) au fost plasate pe o placă cu 96 de godeuri, urmată de adăugarea a 100 ul de ser uman normal 10% sau ser de maimuță cynomolgus sau ser de maimuță verde africană care a fost pre-incubat cu anti -anticorpi C5. Celulele au fost amestecate ușor și incubate la 37°C timp de 60 de minute. După timpul de incubare, celulele au fost centrifugate prin centrifugare la 1250xg la 4°C. Un total de 100 uL de supernatant a fost transferat pe o placă proaspătă cu fund plat de 96 și citit la 412 nm pe cititorul de microplăci Spectramax. Activitatea hemolitică a fost calculată la concentrația serică finală de 5% ser.

Procentul de hemoliză a fost calculat după cum urmează:

$$\% \text{ Hemoliza} = 100 \leftrightarrow \frac{\text{Liza celulară experimentală} - \text{Liza celulară de fond}}{\text{Liza celulară maximă} - \text{Liza celulară de fond}}$$

În această ecuație, „liza celulelor de fundal” este OD la A412nm din celulele incubate în tampon GVB-Mg/EGTA numai care nu conține ser sau fără niciun anticorp anti-C5. „Liza celulară maximă” este OD la A412nm din celulele tratate cu apă. Inhibarea de către anticorpilor anti-C5, valorile IC₅₀ au fost calculate utilizând regresia neliniară (logistica cu 4 parametri) cu software-ul Prism 6 (GraphPad).

Rezultate

(A) Inhibarea hemolizei C5 umane

Un total de 25 de anticorpi anti-umani C5 (hC5), 16 nemutați și 9 mutați, au fost testați pentru capacitatea lor de a inhiba C5 din ser uman normal (NHS) în testul CH50 folosind sânge roșu de oaie sensibilizat (SRBC) și AH50 test folosind celule roșii din sânge de iepure (RRBC).

Tabelul 19: Inhibarea anticorpilor anti-hC5 a activității CP și AP în ser uman normal (NHS) 1% sau 5%

mAb PID	CP Uman	AP Uman	CP Uman	AP Uman
	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	% Inhibiție maximă	% Inhibiție maximă
H4H12183P2	5.88E-09	1.60E-07	99.9%	78.9%
H4H12176P2	4.58E-09	1.65E-08	94.1 %	69.9%
H4H12168P	3.33E-09	2.85E-08	97.5%	66.2%
H4H11686N	3.09E-09	1.30E-08	97.4%	76.2%
H4H12167P	3.68E-09	1.55E-08	99.9%	64.8%
H4H12161P	2.56E-09	2.55E-08	93.7%	56.1%
H4H12163P	2.72E-09	2.05E-08	96.1 %	66.0%
H4H12166P	2.80E-09	2.60E-08	95.0%	70.9%
H4H11683N	2.54E-09	3.40E-08	98.1%	73.2%
H4H12159P	2.50E-09	1.75E-08	97.9%	73.4%
H4H12177P2	2.34E-09	1.70E-08	97.5%	71.0%
H4H12170P	2.39E-09	1.80E-08	98.2%	81.1%

H4H12175P	2.36E-09	2.00E-08	98.0%	80.2%
H4H12171P	2.33E-09	1.55E-08	94.9%	42.0%
H4H12164P	2.10E-09	1.45E-08	95.9%	69.7%
H4H12169P	2.36E-09	2.00E-08	98.3%	44.5%
Controlul izotipului	Fără activitate	Fără activitate	Fără activitate	Fără activitate

Așa cum se arată în Tabelul 19, șaisprezece anticorpi anti-hC5 ai acestei invenții și anticorpii anti-C5 dezvăluți aici au prezentat mai mult de 94% inhibare a hemolizei în calea clasică (CP) mediată de C5 prezent în 1% din ser uman. IC50 ale anticorpilor a variat de la 2,1 la 5,9 nM și procentul de inhibare a variat de la 95%-99%. Toți cei 16 anticorpi anti-C5 au prezentat mai mult de 60% inhibare (cu excepția H4H12169P) în analiza de hemoliză a căii alternative (AP) mediată de C5 prezent în 5% NHS. IC50 ai anticorpilor a variat de la 13 la 160 nM, iar activitatea de inhibare procentuală a variat de la 44% la 81%.

Tabelul 20: Inhibarea anticorpilor anti-hC5 a activității CP și AP în ser uman normal (NHS) 5%

mAb PID	CP Uman	AP Uman	CP Uman	AP Uman
	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	% Inhibiție maximă	% Inhibiție maximă
H4H12166P	1.09E-08	2.09E-08	99.4%	86.9%
H4H12166P2	1.59E-08	4.78E-08	98.2%	81.3%
H4H12166P3	1.34E-08	6.00E-08	95.9%	78.3%
H4H12166P4	1.32E-08	3.17E-08	98.6%	77.0%
H4H12166P5	1.49E-08	6.55E-08	97.1%	77.7%
H4H12166P6	1.03E-08	2.84E-08	98.1%	82.4%
H4H12166P7	2.43E-08	1.56E-07	93.7%	83.2%
H4H12166P8	1.41E-08	7.30E-08	95.7%	73.3%
H4H12166P9	1.16E-08	5.35E-08	93.7%	72.2%
H4H12166P10	4.44E-08	Fără activitate	74.0%	Fără activitate
Controlul izotipului	Fără activitate	Fără activitate	Fără activitate	Fără activitate

După cum se arată în Tabelul 20, toți cei 9 anticorpi anti-hC5 mutați au prezentat inhibarea activității hemolizei CP și AP mediată de C5 prezent în 5% din serul uman. În testul de hemoliză CP, anticorpus parental, nemutat H4H12166P a prezentat o inhibare mai mare de 98% cu IC50 de 10,9 nM. Opt anticorpi anti-hC5 mutați au prezentat mai mult de 90% inhibare cu IC50 variind de la 10,3 nM la 24,3 nM. Anticorpus mutant anti-C5 12166P10 a prezentat o inhibare parțială de 74%. În testul de hemoliză AP, anticorpus parental, nemutat, H4H12166P a arătat o inhibare mai mare de 85% cu IC50 de 20,9 nM. Anticorpii anti-hC5 mutați au prezentat un interval de inhibare de la 72-83%, iar anticorpii IC50s au variat de la 28 nM la 0,15 pM.

(B) Inhibarea hemolizei C5 la maimuță

Un total de 25 de anticorpi anti-umani C5 (hC5), 16 nemutați și 9 mutați, au fost testați pentru capacitatea lor de a inhiba C5 de la maimuța Cynomolgus și maimuța verde africană în testul CH50 folosind sânge roșu de oaie sensibilizat (SRBC) și AH50. Test folosind celule roșii din sânge de iepure (RRBC).

Tabelul 21: Inhibarea anticorpilor anti-hC5 a activității CP și AP în serurile normale de maimuță verde africană (AGM) 5%

	AGM Serum CP	AGM Serum AP	AGM CP	AGMAP
mAb PID	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	% Inhibiție maximă	% Inhibiție maximă
H4H12183P2	Fără activitate	Fără activitate	Fără activitate	Fără activitate
H4H12176P2	3.04E-08	4.77E-08	91.0%	83.2%
H4H12168P	2.80E-08	2.25E-08	90.8%	88.2%

H4H11686N	4.82E-08	1.63E-07	49.3%	50.4%
H4H12167P	6.95E-08	6.95E-08	90.5%	53.4%
H4H12161P	3.19E-08	4.75E-08	78.9%	35.7%
H4H12163P	6.90E-08	2.16E-07	83.2%	58.5%
H4H12166P	1.30E-07	2.33E-07	81.0%	44.2%
H4H11683N	2.92E-08	4.08E-08	81.1%	88.1%
H4H12159P	2.58E-08	2.70E-08	93.4%	93.5%
H4H12177P2	1.80E-07	1.01E-07	80.6%	8.80%
H4H12170P	2.54E-08	2.69E-08	94.9%	90.9%
H4H12175P	1.18E-07	9.85E-08	84.5%	17.4%
H4H12171P	No Activity	2.33E-08	17.8%	69.70%
H4H12164P	2.47E-07	1.78E-07	85.8%	15.60%
H4H12169P	3.44E-08	9.15E-08	43.3%	45.70%

După cum se arată în Tabelul 21, anticorpii anti-hC5 au prezentat niveluri diferite de inhibare a activității hemolizei CP sau AP în seruri de maimuță verde africană 5%. În testul CP, doi dintre cei 16 anticorpi anti-hC5 nu au arătat nicio inhibare a activității de hemoliză. Paisprezece anticorpi au prezentat inhibare variind de la 43-94%, cu IC50 variind de la 25 nM la 180 nM. În testul de hemoliză AP, treisprezece dintre cei 17 anticorpi au prezentat activitate de inhibare variind de la 17%-93% cu IC50 variind de la 22,5 nM la 233 nM.

Tabelul 22: Inhibarea anticorpilor anti-hC5 a activității CP și AP în serurile de maimuță Cynomolgus (Cyno) normale 5%

	Cyno Serum CP	Cyno Serum AP	Cyno CP	Cyno AP
mAb PID	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	% Inhibiție maximă	% Inhibiție maximă
H4H12183P2	1.42E-07	2.96E-08	64.6%	100.0%
H4H12171P	8.70E-09	7.20E-09	92.9%	98.8%
H4H12170P	8.20E-09	7.00E-09	99.0%	99.2%
H4H12159P	7.75E-09	7.05E-09	99.3%	99.6%
H4H12168P	1.03E-08	5.45E-09	99.0%	99.7%
H4H11683N	9.00E-09	7.15E-09	98.8%	98.9%
H4H12176P2	1.47E-08	7.70E-09	97.5%	99.3%
H4H12161P	2.79E-08	7.80E-09	100.0%	98.4%
H4H12169P	1.99E-08	7.95E-09	92.8%	96.30%
H4H11686N	1.41E-08	9.00E-09	94.5%	98.7%
H4H12163P	1.65E-08	1.02E-08	96.4%	98.5%
H4H12167P	2.13E-08	7.60E-09	100.0%	98.30%
H4H12175P	1.09E-08	8.05E-09	96.7%	98.10%
H4H12166P	2.01E-08	8.85E-09	94.2%	98.60%
H4H12177P2	1.71E-08	8.80E-09	94.90%	98.10%
H4H12164P	1.96E-08	9.10E-09	94.7%	98.70%
Controlul izotipului	Fără activitate	Fără activitate	Fără activitate	Fără activitate

După cum se arată în Tabelul 22, anticorpii anti-hC5 (cu excepția H4H12183P2, care au prezentat o inhibare de 64% CP) au prezentat o inhibare de peste 90% a testului de hemoliză CP sau AP în 5% din serul de maimuță *Cynomolgus*.

În testul de hemoliză CP, IC50-urile anticorpilor au variat de la 7,15 nM la 142 nM. În testul de hemoliză AP, IC50-urile anticorpilor au variat între 5,4 și 29,6 nM.

(C) Inhibarea hemolizei C5 umane variante

Anticorpii anti-C5 selectați au fost testați pentru capacitatea lor de a inhiba varianta C5 umană (vezi Exemplul 3 de aici) din serul uman sărăcit în C5 în testul CH50. În ser uman sărăcit în C5 suplimentat cu varianta exogenă C5 R885H, H4H12166P și Comparatorul 2 au blocat hemoliza CP cu valori IC50 de 6,0 nM și, respectiv, 4,4 nM și valori IC80 de 7,6 nM și, respectiv, 5,5 nM. Pentru varianta R885C, H4H12166P și Comparatorul 2 au blocat hemoliza CP în ser uman sărăcit în C5 cu variante C5 exogene cu un IC50 de 9,3 nM și respectiv 6,8 nM și valori IC80 de 11 nM și, respectiv, 8,2 nM. După cum era de așteptat, Comparatorul 1 nu a blocat activitatea hemolitică a variantelor C5 umane.

(D) Inhibarea complexului CSb-6 uman

Anticorpii anti-C5 selectați au fost testați pentru capacitatea lor de a inhiba complexul uman C5b-6 din serul uman sărăcit în C5 în testul CH50. H4H12166P a blocat puternic hemoliza CP în ser uman sărăcit în C5, suplimentat cu complex exogen huC5b-6 cu un IC50 de 3,8 nM și o valoare IC80 de 5,8 nM. În contrast, Comparatorul 1 a blocat hemoliza mediată de complexul C5b-6 cu potență mai mică, cu valori IC50 de 5,0 nM și, respectiv, valoare IC80 de 46 nM. Comparatorul 1 a inhibat doar 70% hemoliza totală la cele mai mari concentrații testate. Comparatorul 2 nu a blocat activitatea hemolitică a complexului C5b-6 uman.

Exemplul 9: Anticorpii anti-C5 blochează generarea de C5a în testul de hemoliză CP

Pentru a evalua dacă anticorpii anti-C5 inhibă generarea de C5a, supernatanții din testul pentru hemoliza căii clasice (CP) au fost analizați pentru nivelurile de CSa prin ELISA.

C5a, generat ca rezultat al clivajului C5, este un fragment proteic de 74 de aminoacizi. C5a este metabolizat rapid de carboxipeptidazele serice la o formă mai stabilă, mai puțin activă, de 73 de aminoacizi, C5a des-Arg, prin îndepărtarea argininei C-terminale. Prin urmare, cuantificarea C5a des-Arg oferă o măsurătoare fiabilă pentru monitorizarea generării de C5a *in vivo* și *in vitro*. Kitul MicroVue C5a ELISA utilizat aici detectează C5a des-Arg conform informațiilor furnizate de producător.

Experimentele preliminare (datele nu sunt prezentate) indică faptul că forma primară de 74 de aminoacizi a C5a este de asemenea detectată. În scopul acestui exemplu, ambele forme vor fi denumite în mod colectiv „C5a”.

Nivelurile de proteină C5a au fost determinate în supernatanți din testul de hemoliză CP utilizând ser uman normal conservat cu complement (NHS) pre-incubat cu H4H12166P sau anticorp de control izotip așa cum este descris în Exemplul 8. Nivelurile proteinei C5a au fost măsurate folosind kitul ELISA MicroVue C5a conform instrucțiunilor producătorului. Pe scurt, probele au fost diluate și incubate pe plăci pre-acoperite cu anticorp de captură (anti-C5a de șoarece specific pentru un neo-epitop pe C5a uman). Proteina umană C5a furnizată de producător a fost utilizată ca standard pentru calibrare. C5a în supernatanți a fost detectat prin anticorpii de detecție conjugat cu HRP (anticorp monoclonal de șoarece la regiunea C5a a C5). Substratul HRP cromogen, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidină (TMB), a fost adăugat pentru a detecta activitatea HRP. O soluție de acid clorhidric 1 N a fost utilizată pentru a opri reacția, iar densitatea optică la 450 nm (OD450) a fost măsurată pe un cititor de plăci SpectraMax. Datele au fost analizate folosind regresia neliniară (logistica cu 4 parametri) în GraphPad Prism. Concentrația C5a a fost exprimată ca ng/mL de supernatant.

În testul folosind 5% NHS, H4H12166P a blocat puternic creșterile nivelurilor de proteină C5a într-o manieră dependentă de doză cu un IC50 de 8,5 nM, în timp ce anticorpii de control izotip nu a avut niciun efect asupra nivelurilor C5a (Figura 1). Blocarea maximă la cea mai mare concentrație de H4H12166P testată (267 nM) a dus la o scădere de ~10 ori a nivelurilor de C5a la 3,8 ng/mL (0,3 nM), comparativ cu 34 ng/mL (2,8 nM) observată la cea mai mică concentrație de H4H12166P testată (1 nM) în ser 5%. Concentrația C5a observată pentru blocarea maximă a fost apropiată de nivelul inițial de C5a de 2,3 ng/mL (0,2 nM) în NHS 5% netratat.

Exemplul 10: Caracterizarea farmacocineticii și farmacodinamicii anticorpilor anti-C5 la maimuța cynomolgus

Acest exemplu descrie caracterizarea farmacocineticii (PK) și farmacodinamicii (PD) a anticorpilor anti-C5 selectați efectuate la masculi de maimuță *cynomolgus*.

Nivelurile C5 endogene au fost determinate înainte de dozarea anticorpilor anti-C5 și utilizate pentru a stratifica grupurile de doze la animale.

Nivelurile totale de C5 circulant la maimuțele cynomolgus au fost determinate utilizând un ELISA al complementului uman C5 (Abcam, cat # ab125963), care a fost efectuat conform recomandărilor producătorului. Concentrațiile medii de proteină C5 la maimuțe au fost determinate a fi de $90,85 \mu\text{g/mL} \pm 19,17 \mu\text{g/mL}$.

Pentru fiecare anticorp anti-C5, câte 4 maimuțe cynomolgus li s-a administrat o singură injecție intravenoasă (IV) la o doză de 15 mg/kg . Au fost colectate probe de sânge de la fiecare animal de la pre-doza până la 1680 de ore (70 de zile), procesate în ser și congelate la -80°C până la analizarea PK și PD. Analiza nivelului total de anticorpi IgG prin imunotest ELISA

Concentrațiile totale de anticorpi din probele de ser de maimuță au fost măsurate utilizând un ELISA direct nevalidat. Procedura ELISA a folosit o placă de microtitrare acoperită cu un anticorp monoclonal anti-uman IgG1/IgG4 Fc de șoarece. Pe placă s-au adăugat diferiți anticorpi anti-C5 și anticorpii anti-C5 capturați pe placă au fost detectați utilizând un anticorp monoclonal anti-uman IgG4 Fc de șoarece biotinitat, urmat de NeutrAvidin conjugat cu peroxidază de hrean (NeutrAvidin HRP). Un substrat pe bază de luminol specific pentru peroxidază a fost apoi adăugat pentru a obține o intensitate a semnalului care este proporțională cu concentrația totală de anticorp anti-C5 capturat. Măsurătorile unității de lumină relativă (RLU) ale standardelor de calibrare și concentrațiile lor nominale respective au fost ajustate utilizând o ecuație logistică ponderată cu 4 parametri pentru a genera o ecuație de calibrare care a descris concentrația de anticorpi anti-C5 și relația de răspuns a testului. Limita inferioară de cuantificare (LLOQ) a fost de $1,56 \text{ ng/mL}$ în test (2% ser de maimuță) și 78 ng/mL în ser de maimuță curat.

Determinarea parametrilor PK

Parametrii PK au fost determinați prin analiză non-compartimentală (NCA) utilizând software-ul Phoenix[®]WinNonlin[®] (Versiunea 6.4, Certara, L.P.) și un model de dozare în bolus IV.

Toți parametrii PK au fost derivați din valorile concentrației medii respective, inclusiv concentrația maximă observată în ser (C_{max}), timpul de concentrație maximă observată, t_{max} și timpul de înjumătățire estimat observat ($T_{1/2}$). Pentru fiecare anticorp, aria de sub curba concentrație față de timp până la ultima concentrație măsurabilă (AUC_{last}) și extrapolată de la timpul zero la infinit (AUC_{inf}) a fost determinată folosind o regulă trapezoidală liniară cu interpolare liniară și ponderare uniformă.

Analiza PD prin test de hemoliză ex vivo

Farmacodinamica anticorpilor anti-C5 selectați a fost analizată utilizând teste de hemoliză ex vivo ale căii clasice și ale căilor alternative.

Testul hemolizei pe calea clasică: globulele roșii de oaie (SRBC) au fost spălate în tampon GVB++ (Gelatin Veronal Buffer cu CaCl_2 și MgCl_2) (Boston BioProducts) și resuspendate la 1×10^9 celule/mL. Pentru a sensibiliza SRBC, un total de $1 \times 10^9/\text{mL}$ de SRBC au fost amestecate cu un volum egal de hemolizină anti-oaie de iepure diluată 1:50 ($1,5 \text{ mg/mL}$) la 37°C timp de 20 de minute. SRBC-urile sensibilizate au fost diluate la 2×10^8 celule/mL în tampon GVB++ înainte de a fi utilizate în testul de hemoliză. Sângele de la maimuțele cynomolgus a fost recoltat înainte de administrare și la 5 minute, 4 și 8 ore și 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 18, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 și 70 de zile după doză pentru analiza PD. Serul a fost preparat și congelat până la utilizarea ulterioară. În ziua testului, serul de cynomolgus din momentele respective a fost diluat la 10% în tampon GVB++. Plăci cu 96 de godeuri cu fund rotund au fost utilizate pentru a măsura activitatea de hemoliză. Un total de 100 μL de SRBC sensibilizate (2×10^8 celule/mL) au fost plasate pe o placă cu 96 de godeuri la 37°C , urmată de adăugarea a 100 μL de ser de maimuță cynomolgus 10% din momentele respective. SRBC-urile au fost amestecate ușor și incubate la 37°C timp de 10 minute. După timpul de incubare, celulele au fost centrifugate la $1250 \times g$ la 4°C . Un total de 100 μL de supernatant a fost transferat pe o placă cu fund plat proaspăt 96 și citit la 412 nm pe un cititor de microplăci Spectramax. Activitatea hemolitică a fost calculată la concentrația serică finală de 5%. Procentul de hemoliză a fost calculat cu valorile absorbanței utilizând următoarea ecuație:

$$\% \text{ Hemoliza} = 100 \leftrightarrow \frac{(\text{Liza celulară experimentală} - \text{Liza celulară de fond})}{(\text{Liza celulară maximă} - \text{Liza celulară de fond})}$$

În această ecuație, „liza celulelor de fundal” este OD la 412nm din SRBC-urile incubate în tampon GVB++ care nu conține doar ser. „Liza celulară maximă” este OD la 412nm de la SRBC tratate cu apă. Rezultatele, exprimate ca % hemoliză, au fost analizate utilizând regresia neliniară (logistica cu 4 parametri) cu software-ul Prism 5 (GraphPad) pentru a obține valorile IC_{50} . Datele sunt reprezentate ca medie $\pm$ Eroare standard a mediei.

Testul de hemoliză a căii alternative: numărul dorit de globule roșii de iepure (RbRBC) a fost spălat în tampon GVB- Mg^{2+} /EGTA și re-suspendat la 2×10^8 celule/mL. Sângele de la maimuțele cynomolgus a fost recoltat înainte de administrare și la 5 minute, 4 și 8 ore și la 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 18, 21, 28, 35, 42 și 49 de zile după doza de PD analiză. Serul a fost preparat și congelat până la utilizarea ulterioară. Plăci cu 96 de godeuri cu fund rotund au fost utilizate pentru a măsura activitatea de hemoliză. Un total de 100 μL RbRBC (2×10^8 celule/mL) au fost plasate pe o placă cu 96 de godeuri la 37°C urmată de adăugarea

a 100 µl de ser de maimuță cynomolgus 10% din momentele respective enumerate mai sus. RbRBC au fost amestecate ușor și incubate la 37°C timp de 60 de minute. După timpul de incubare, celulele au fost centrifugate la 1250xg la 4°C. Un total de 100 µl de supernatant a fost transferat pe o placă proaspătă cu fund plat de 96 care a fost citită la 412 nm pe un cititor de microplăci Spectramax. Activitatea hemolitică a fost calculată pentru concentrația serică finală de 5% și exprimată ca procent din hemoliza totală a RBC de către apă.

Procentul de hemoliză a fost calculat așa cum este descris mai sus.

Rezultate

Anticorpul anti-CS selectat (listați în Tabelul 1) au fost testați în experimentele inițiale pentru profiluri farmacocinetice prelungite la maimuțe cynomolgus și șoareci umanizați C5 (descrie în Exemplul 10). H4H12166P și H4H12161P au fost selectați ca având afinitate mare cuplată cu PK prelungită și utilizate în experimentele ulterioare de aici cu Comparatorul 1 și Comparatorul 2.

Maimuțelor Cynomolgus li s-a administrat o singură doză în bolus IV de 15 mg/kg de H4H12166P, H4H12161P sau Comparator 2. Concentrațiile serice ale anticorpului total și activitatea de hemoliză procentuală a căii clasice (CP) au fost determinate la 19 momente în timpul unei perioade de viață de 70 de zile. Hemoliza căii alternative (AP) a fost determinată la 17 momente de timp pe o perioadă de 50 de zile în viață. Tabelul 23 rezumă concentrațiile medii de anticorpi pentru toți cei 3 anticorpi. Concentrațiile totale medii de anticorpi față de profilurile de timp sunt prezentate în Figura 2. Parametrii medii PK sunt descriși în Tabelul 24.

Tabelul 23: Concentrațiile medii ale IgG totale în ser după o singură injecție intravenoasă de 15 mg/kg de anticorpi anti-C5 selectați la maimuțe Cynomolgus masculi

Timp (ore după doză)	#	Concentrația serică de Ab (µg/mL) Media ±SD		
		H4H12166P	H4H12161P	Comparatorul 2
0	4	BLQ	BLQ	BLQ
0.083	4	445 ±30	456 ±26.2	459 ±55.2
4	4	328 ±27	360 ±28.2	363 ±43.8
8	4	353±29.9	316 ±21.5	357 ±16.1
24	4	282 ±43.6	276 ±32.4	248 ±19.6
48	4	225 ±15.2	221 ±21.5	212 ±19.3
72	4	180 ±15.0	181 ±17.2	196 ±36.2
120	4	194 ±20.9	162 ±10.7	179 ±23.3
168	4	171 ±29.9	132 ±17.0	157 ±18.4
240	4	157 ±12.7	96.1 ±17.3	114 ±13.0
336	4	120 ±10.2	49.3 ±18.7	67.9 ±25.8
432	4	105 ±13.9	24.6 ±11.8	42.6 ±15.9
504	4	92.2 ±10.6	13.8 ±9.95	28.6 ±13.1
672	4	75.1 ±15.8	6.16 ±2.40	10.9 ±6.25
840	3	59.6 ±4.79	2.44 ±0.85	4.45 ±2.63
1008	3	43.3 ±2.89	1.16 ±0.52	2.17 ±1.58
1176	3	30.6 ±1.42	0.57 ±0.25	1.29 ±1.16
1344	3	25.9 ±3.74	0.315 ±0.16	0.492 ±0.49
1512	3	18.2 ±2.41	0.17 ±0.08	0.270 ±0.27
1680	3	11.5 ±1.51	0.079±0.07	0.123 ±0.15
Timp = Timp în ore după injecția cu doză unică; SD = Abatere standard; BLQ = Sub limita de cuantificare				

După administrarea în bolus IV, profilurile concentrației totale de IgG-timp ale H4H12166P, H4H12161P și Comparatorul 2 au fost caracterizate printr-o fază inițială de distribuție scurtă urmată de faze de eliminare unică pe parcursul perioadei de viață. Concentrațiile de vârf H4H12166P, H4H12161P și Comparator 2 au fost foarte comparabile, deoarece valorile corespunzătoare C_{max}/Doza dintre toți anticorpulii au fost de 1,1 ori (29,7, 30,4 și, respectiv, 30,6 [(µg/mL)/(mg/kg)]) (Tabelul 24).

Tabelul 24: Parametrii farmacocinetici medii ai concentrațiilor totale de IgG în ser după o singură injecție intravenoasă de 15 mg/kg de anticorpi anti-C5 selectați la masculii Cynomolgus

Parametru	H4H12166P	H4H12161P	Comparator 2
	15 mg/kg IV (n = 4)		

	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
$C_{\max}$ ($\mu\text{g/mL}$)	445	30.0	456	26.2	459	55.2
$C_{\max}/\text{Dose}$ ($\mu\text{g/mL}$)/(mg/kg)	29.7	2.00	30.4	1.75	30.6	3.68
C_0 ($\mu\text{g/mL}$)	448	30.5	458	26.6	461	55.6
$t_{\max}$ (hours)	0.083	0	0.083	0	0.083	0
$\text{AUC}_{\text{last day}}$ ($\mu\text{g/mL}$)	5080	1040	2350	357	2810	470
$\text{AUC}_{\text{last day}}$ ($\mu\text{g/mL}$)/(mg/kg)	339	69.3	157	23.8	187	31.3
$\text{AUC}_{\text{inf day}}$ (mg/mL)	5550	671	2350	356	2810	470
$\text{AUC}_{\text{inf day}}$ ($\mu\text{g/mL}$)/(mg/kg)	370	44.7	157	23.7	188	31.4
CL (mL/h/kg)	0.114	0.0143	0.270	0.0411	0.228	0.0425
V_{ss} (mL/kg)	60.4	4.85	44.0	4.34	45.3	3.06
$t_{1/2}$ (day)	15.6	1.43	5.50	2.45	5.91	1.13

IV = intravenos; n = Numărul de animale; $C_{\max}$ = Concentrație maximă; C_0 = Concentrația inițială determinată prin extrapolare; $t_{\max}$ = Timpul până la $C_{\max}$; AUC = Aria sub curba concentrație-timp; AUC_{last} = AUC calculată de la momentul zero până la momentul ultimei concentrații pozitive; AUC_{inf} = AUC din timpul zero extrapolat la infinit; CL = clearance-ul total al corpului; V_{ss} = Volumul de distribuție la starea de echilibru; $t_{1/2}$ = Timp de înjumătățire; SD = Deviația standard. Notă: $t_{\max}$ este exprimat în ore nominale

Evaluarea profilurilor concentrație-timp a arătat că H4H12166P a demonstrat cea mai lentă eliminare cu concentrații terminale de anticorpi $\geq 10 \mu\text{g/mL}$ până în ziua de studiu 71. Cinetica H4H12161P și a Comparatorului 2 a fost similară; ambele au demonstrat o eliminare mai rapidă decât H4H12166P, cu concentrații de mAb $\geq 10 \mu\text{g/mL}$ până în ziua 22 și, respectiv, 29.

În consecință, expunerile normalizate în funcție de doză ($\text{AUC}_{\text{last}}/\text{Doză}$) au indicat că H4H12166P a avut cea mai mare expunere la 339 zile*($\mu\text{g/mL}$)/(mg/kg), în timp ce H4H12161P și Comparator 2 au avut o expunere de aproximativ 2 ori mai mică, 157 și 187. zi*($\mu\text{g/mL}$)/(mg/kg), respectiv, decât cea a H4H12166P.

Timpul de înjumătățire al anticorpilor ($t_{1/2}$) calculat în timpul fazei de eliminare a variat între 5,5 și 15,6 zile în grupurile de doză și, de asemenea, a fost corelat cu expunerea, deoarece H4H12166P a avut cel mai mare $t_{1/2}$ de 15,6 zile, în timp ce H4H12161P și Comparatorul 2 au avut valorile $t_{1/2}$ de 5,5 și 5,9 zile, respectiv.

Efectele farmacologice ale anticorpilor anti-C5 din probele de ser de maimuță cynomolgus au fost determinate ex vivo prin hemoliza pe calea clasică a complementului (CP) a globulelor roșii de oaie sensibilizate (SRBC) și hemoliza pe cale alternativă (AP) a globulelor roșii de iepure (RbRBC). Inhibarea activității hemolitice a fost calculată pentru o concentrație serică finală de 5% și exprimată ca procent din hemoliza totală a RBC de către apă. Tabelul 25 rezumă activitatea ex vivo a celor 3 anticorpi determinată prin procentul mediu de hemoliză.

Tabelul 25: Procentul de activitate de hemoliză a căii clasice și alternative ex vivo a anticorpilor anti-C5 selectați

Timp (ore# după doză)		Calea clasică % hemoliză în serul cynomolgus, 10 min, medie $\pm$ SEM			Calea alternativă % hemoliză în serul cynomolgus, 60 min, medie $\pm$ SEM		
		H4H12166P	H4H12161 P	Comparator 2	H4H12166P	H4H12161P	Comparator 2
0	4	91.34 $\pm$ 7.6	Nu a fost testat	84.36 $\pm$ 20.28	73.44 $\pm$ 17.26	64.90 $\pm$ 19.51	55.77 $\pm$ 10.82
0.083	4	3.5 $\pm$ 1.4	Nu a fost testat	6.6 $\pm$ 6.5	5.53 $\pm$ 1.98	5.90 $\pm$ 3.92	3.83 $\pm$ 3.93
4	4	2.35 $\pm$ 1.06	Nu a fost testat	3.16 $\pm$ 2.2	7.43 $\pm$ 2.54	6.53 $\pm$ 2.7	5.30 $\pm$ 2.80
8	4	1.55 $\pm$ 0.21	Nu a fost testat	1.25 $\pm$ 0.21	3.53 $\pm$ 0.91	4.70 $\pm$ 2.77	1.98 $\pm$ 0.83
24	4	7.7 $\pm$ 6.08	Nu a fost testat	4.55 $\pm$ 2.05	13.40 $\pm$ 2.77	4.68 $\pm$ 1.89	4.65 $\pm$ 2.35
48	4	2.85 $\pm$ 2.19	Nu a fost testat	2.6 $\pm$ 0.7	5.53 $\pm$ 2.40	7.68 $\pm$ 5.22	2.28 $\pm$ 0.67

72	4	0.9 ± 0.42	Nu a fost testat	1.3 ± 0.28	7.95 ± 3.36	5.95 ± 2.23	1.45 ± 0.33
120	4	1.75 ± 0.07	Nu a fost testat	1.3 ± 0.14	16.38 ± 6.91	7.60 ± 1.94	1.68 ± 0.22
168	4	1.6 ± 1.13	Nu a fost testat	1.4 ± 0.56	21.28 ± 8.24	10.75 ± 2.27	2.15 ± 0.19
240	4	1 ± 0.14	Nu a fost testat	3.7 ± 2.83	19.18 ± 10.20	13.53 ± 7.17	14.20 ± 6.73
336	4	2.55 ± 2.05	Nu a fost testat	37.85 ± 5.3	21.10 ± 7.55	50.58 ± 12.91	65.60 ± 6.04
432	4	1.35 ± 0.91	Nu a fost testat	105.25 ± 3.3	15.20 ± 10.86	59.75 ± 12.65	54.55 ± 9.11
504	4	3.55 ± 2.05	Nu a fost testat	107.1 ± 4.38	33.15 ± 8.80	88.55 ± 24.63	85.63 ± 27.48
672	4	2.2 ± 0.56	Nu a fost testat	88.9 ± 23.05	75.25 ± 18.30	88.55 ± 8.53	91.58 ± 8.55
840	3	3.075 ± 2.70	Nu a fost testat	105.37 ± 53.4	46.65 ± 5.30	92.33 ± 5.16	91.85 ± 2.33

Timp (ore după doză)	#	Calea clasică % hemoliză în serul cynomolgus, 10 min, medie ± SEM			Calea alternativă % hemoliză în serul cynomolgus, 60 min, medie ± SEM		
		H4H12166P	H4H12161P	Comparator 2	H4H12166P	H4H12161P	Comparator 2
1008	3	15.5 ± 26.6	Nu a fost testat	108.85 ± 2.35	58.60 ± 9.48	92.45 ± 6.27	92.30 ± 2.69
1176	3	58.33 ± 39.55	Nu a fost testat	113.85 ± 2.62	72.95 ± 5.87	104.90 ± 3.5	101.90 ± 0.42
1344	3	71.55 ± 43.02	Nu a fost testat	110.3 ± 1.98	Nu a fost testat	Nu a fost testat	Nu a fost testat
1512	3	91.375 ± 29.7	Nu a fost testat	110.6 ± 0.85	Nu a fost testat	Nu a fost testat	Nu a fost testat
1680	3	112.22 ± 4.06	Nu a fost testat	112.15 ± 0.5	Nu a fost testat	Nu a fost testat	Nu a fost testat

Timp = Timp în ore după injectarea cu doză unică; SEM = Eroarea standard a mediei; BLQ = Sub limita de cuantificare; NC = Necalculat

După cum se arată în Tabelul 25 și Figura 2, efectele PD au fost măsurate prin CP complement (incubare de 10 minute) până în ziua 70. H4H12166P a blocat mai mult de 95% din activitatea hemolitică a CP până în ziua 35. Activitatea a revenit la nivelurile maxime de hemoliză pre-studiu până în ziua 70. Comparatorul 2 a blocat aproximativ 95% din activitatea hemolitică CP până în ziua 10, iar activitatea a revenit rapid la nivelurile maxime de hemoliză pre-studiu până în ziua 18.

Efectele PD au fost, de asemenea, măsurate prin teste de hemoliză ale căii AP complementului (incubare la 60 de minute) până în ziua 49. După cum se arată în Tabelul 25 și Figura 3, H4H12166P a blocat 80% din activitatea hemolitică AP totală până în ziua 18 și activitatea a revenit la nivelul maxim de hemoliză pre-studiu în ziua 50. H4H1216P și Comparatorul 2 au blocat 90% din activitatea hemolitică AP până în ziua 7, iar activitatea a revenit la nivelurile maxime de hemoliză dinainte de studiu până în ziua 21.

Exemplul 11: Caracterizarea PK/PD a anticorpilor anti-C5 la șoarecii umanizați C5

În acest set de experimente, farmacocinetica și farmacodinamica anticorpilor anti-C5 selectați au fost evaluate la șoarecii umanizați pentru a exprima proteina C5 umană folosind tehnologia Velocigene® (Valenzuela și colab. 2003, Nat. Biotehnologia. 21: 652-659). Șoarecii umanizați au fost modificați pentru a înlocui exonul 2 prin exonul 41 al genei C5 murine cu exonii 2-42 ai genei C5 umane (dezvăluți în Publicația cererii de brevet US 2015/0313194, încorporată aici în întregime).

Nivelurile totale de C5 uman circulant au fost determinate utilizând un ELISA al Complementului Uman C5 (Abcam, cat # ab125963), care a fost efectuat conform recomandărilor producătorului.

Determinarea nivelului total de medicament în ser prin ELISA

Concentrațiile de anticorpi anti-C5 circulanți, atât legați de C5, cât și nelegați, au fost determinate prin analiza anticorpilor umani totali folosind ELISA. Pe scurt, un anticorp policlonal de capră anti-IgG umană la 1 pg/mL în PBS a fost imobilizat pe plăci cu 96 de godeuri peste noapte; plăcile au fost spălate pentru a îndepărta IgG nelegată și apoi blocate cu 5% BSA. Diluțiile în serie de anticorpi anti-C5 care conțineau probe de ser (6 puncte) și standardele de referință (12 puncte) ale anticorpilor respectivi au fost transferate pe plăcile acoperite cu IgG anti-uman și incubate timp de o oră. Anticorpii anti-C5 legați de plăci au fost apoi detectați utilizând un anticorp policlonal de capră anti-IgG umană conjugat cu peroxidază de hrean. Plăcile au fost dezvoltate cu substrat TMB conform protocolului recomandat de producător și

semnalele de densitate optică (OD) la 450 nm au fost înregistrate folosind un cititor de plăci multimodal Perkin Elmer Victor X4. Concentrațiile de anticorpi anti-C5 în ser au fost calculate pe baza curbei de calibrare standard de referință generată folosind software-ul GraphPad Prism.

Determinarea parametrilor PK

Parametrii PK au fost determinați prin analiză non-compartmentală (NCA) folosind software-ul Phoenix®WinNonlin® (Versiunea 6.3, Certara, L.P.) și un model de dozare extravasculară. Folosind valorile medii ale concentrației respective pentru fiecare anticorp, toți parametrii PK, inclusiv timpul de înjumătățire estimat observat ($t_{1/2}$) și aria sub curba concentrație față de timp până la ultima concentrație măsurabilă (AUC_{last}) au fost determinați folosind o regulă trapezoidală liniară cu liniară interpolare și ponderare uniformă.

Analiza PD prin test de hemoliză

Farmacodinamica anticorpilor anti-C5 selectați a fost determinată utilizând un test clasic de hemoliză a complementului căii. Globulele roșii de oaie (SRBC) (Sânge de oaie în soluție Alsevers) au fost spălate în tampon GVB++ (Gelatin Veronal Buffer cu $CaCl_2$ și $MgCl_2$) (Boston BioProducts) și resuspendate la 1×10^9 celule/mL. Pentru sensibilizare, 1×10^9 /mL de SRBC au fost amestecate cu volum egal de hemolizină anti-oaie de iepure diluată 1:50 (1,5 mg/mL) la 37°C timp de 20 de minute. SRBC-urile sensibilizate au fost diluate la 2×10^8 celule/mL în GVB++ înainte de a fi utilizate în testul de hemoliză. Probele de ser de la animale pre-dozate sau de la șoareci C5 umanizați dozați cu anticorpi anti-C5 colectați în zilele 10, 20, 30, 40 și 50 după doză au fost diluate la 20% în tampon GVB++. Un total de 100 μ L SRBC-uri sensibilizate (2×10^8 celule/mL) au fost plasate pe plăci cu fund rotund cu 96 de godeuri la 37°C, urmată de adăugarea a 100 μ L de ser 20% care a fost suplimentat cu 160-180 μ g/mL complement uman 3 proteina (huC3). Celulele au fost amestecate ușor și incubate la 37°C timp de 1 oră. După incubare, celulele au fost centrifugate la 1250xg la 4°C. Un total de 100 μ L de supernatant a fost transferat pe o placă proaspătă cu fund plat 96 și citit la 412nm pe un cititor de microplăci Spectramax.

Procentul de hemoliză a fost calculat cu valorile absorbanței utilizând următoarea ecuație:

$$\% \text{ Hemoliza} = 100 \leftrightarrow \frac{(\text{Liza celulară experimentală} - \text{Liza celulară de fond})}{(\text{Liza celulară maximă} - \text{Liza celulară de fond})}$$

În această ecuație, „liza celulelor de fundal” este OD la 412nm de la SRBC-uri incubate în tampon GVB++ care nu conține doar ser. „Liza celulară maximă” este OD la 412nm de la SRBC tratate cu apă. Rezultatele, exprimate ca % hemoliză, au fost analizate utilizând regresia neliniară (logistica cu 4 parametri) cu software-ul Prism 6 (GraphPad) pentru a obține valorile IC_{50} . Datele reprezentate ca medie $\pm$ (Eroarea standard a mediei).

Experimentul 1

În acest experiment, farmacocinetica și farmacodinamia anticorpului exemplar H4H12166P au fost evaluate în comparație cu Comparatorul 1 și Comparatorul 2 la șoarecii C5 umanizați. Nivelurile totale de C5 uman circulant au fost determinate utilizând un ELISA al Complementului Uman C5 (Abcam, cat # ab125963), care a fost efectuat conform recomandărilor producătorului. Concentrațiile medii de C5 uman la șoareci au fost determinate a fi $39,73 \text{ pg/mL} \pm 17,82 \text{ pg/mL}$. A existat o diferență între șoarecii masculi ($55,4 \pm 1,7 \text{ pg/mL}$, $n=47$) și femele ($24,7 \pm 0,6 \text{ pg/mL}$, $n=49$).

Înainte de dozarea anticorpilor, șoarecii C5 masculi și femele umanizați au fost stratificați în funcție de nivelurile de C5 umane care au avut o medie de 40 pg/mL. Pentru fiecare anticorp anti-C5, cohorte de douăzeci și doi de șoareci au primit o singură doză de 15 mg/kg de H4H12166P, Comparator 1 sau Comparator 2 prin injecție subcutanată (s.c.). Toți șoarecii au fost sângeați înainte de dozare și la o zi după injectare pentru analiza PK. În plus, la 10, 20, 30, 40 și 50 de zile după injectare, grupuri de 4 sau 5 șoareci din fiecare cohortă au fost eutanasiați și au fost colectate sângerări terminale pentru analiza PK și PD. Probele de ser din ziua 1 au fost media întregii cohorte de 22 de șoareci. Sângele a fost procesat în ser și congelat la -80 °C până a fost analizat.

Concentrațiile totale de anticorpi au fost determinate la 7 puncte de timp și activitatea de hemoliză procentuală a fost determinată la 6 momente de timp pe parcursul perioadei de viață de 50 de zile. Concentrațiile totale de anticorpi anti-C5 sunt rezumate în Tabelul 26. Concentrațiile totale medii de anticorpi față de profilul de timp sunt prezentate în Figura 4. Parametrii medii PK sunt descriși în Tabelul 27.

Tabelul 26: Concentrațiile medii ale IgG totale în ser după o singură injecție subcutanată de 15 mg/kg de anticorpi anti-C5 la șoarecii C5 umanizați

Ora (Ziua)	#	Concentrația serică de Ab (μ g/mL) Medie $\pm$ SD		
		H4H12166P	Comparatorul 1	Comparatorul 2
1	22	178 $\pm$ 22.7	229 $\pm$ 40.7	164 $\pm$ 24.1
10	4	83.7 $\pm$ 22.2	102 $\pm$ 22.9	44 $\pm$ 24.1
20	5	57.1 $\pm$ 26.8	29 $\pm$ 31.3	11.4 $\pm$ 10.3

30	5	38.1±7.6	30.1±34.2	3.6±3.2
40	4	11.9±5.0	0.4±0.4	0.5±0.4
50	4*	9.3±12.2	0.3±0.3	0.3±0.2

Timp = Timp în ore după injectarea cu doză unică; Zi = Zi de studiu; SD = Abatere standard; SEM = Eroarea standard a mediei; ND = Nedetectat; NS = Fără probă. *Pentru Comparatorul 2, ziua 50, n= trei din cauza incapacității unui eșantion de a fi analizat din cauza unor probleme tehnice.

Tabelul 27: Parametrii PK

Parametru	Unități	H4H1216 6P	Comparator 1	Comparator 2
Concentrația mAb în ziua 1	μg/mL	178	229	164
AUC _{last}	zi·μg/mL	2801	2708	1418
t _{1/2}	d	11.3	4.7	7.6

C_{max} = Concentrație maximă; AUC = Aria sub curba concentrație-timp; AUC_{last} = AUC calculată de la momentul zero până la momentul ultimei concentrații pozitive; T_{1/2} = Timpul de înjumătățire estimat observat

- 5 Profilurile de concentrație medie față de timp în ziua 1 arată că cei trei anticorpi, H4H12166P, Comparatorul 1 și Comparatorul 2 au avut concentrații serice comparabile de 178, 229 și, respectiv, 164 pg/mL. Comparatorul 1 a avut un profil de eliminare similar cu H4H12166P până în ziua 30, dar în zilele 40 și 50 a prezentat o creștere rapidă a clearance-ului față de H4H12166P. În ziua 50, H4H12166P a avut o concentrație medie a anticorpilor în ser de aproximativ 9 pg/mL, în timp ce Comparatorul 1 și Comparatorul 2 aveau ambele o concentrație medie în ser de anticorpi de 30 de ori mai mică de 0,3 pg/mL.
- 10 Comparatorul 2 a prezentat cea mai scăzută expunere dintre cei trei anticorpi testați, cu o AUC_{last} de aproximativ 2 ori mai mică (1408 zi·μg/mL) în comparație cu H4H12166P (2801 zile·μg/mL) și Comparatorul 1 (2708 zile·μg/mL).

- 15 Efectele farmacologice ale anticorpilor anti-C5 H4H12166P, Comparatorul 1 și Comparatorul 2 din probele de ser de șoarece C5 umanizate suplimentate cu C3 uman au fost măsurate până în ziua 50 și au fost determinate ex vivo prin hemoliza pe calea clasică a complementului (CP) a SRBC sensibilizat. Procentul mediu de hemoliză pentru fiecare anticorp anti-C5 este rezumat în Tabelul 28, iar procentul mediu de hemoliză în raport cu profilul de timp este prezentat în Figura 5.

Tabelul 28: Procentul de activitate de hemoliză a căii clasice ex vivo a anticorpilor anti-umani C5

Ora (Ziua)	#	Calea clasică % hemoliză în ser de șoarece 10%, 60 min, medie ± SEM		
		H4H12166P	Comparatorul 1	Comparatorul 2
1	22	NS	NS	NS
10	4	12.6±7.79	10.39±2.88	12.06±9.12
20	5	18.8±8.1	21.59±17.53	65.08±52.87
30	5	13.76±10.9	78.98±40.3	91.67±16.74
40	4	41.71±40.7	101.09±4.01	68.99±42.47
50	4*	62.2±56.6	88.99±17.51	105.14±4.07

Timp = Timp în ore după injectarea cu doză unică; Zi = Zi de studiu; SEM = Eroarea standard a mediei; ND = Nedetectat; NS = Fără probă.
*Pentru Comparatorul 2, ziua 50, n= trei din cauza incapacității unui eșantion de a fi analizat din cauza unor probleme tehnice

- 20 H4H12166P, Comparatorul 1 și Comparatorul 2 au inhibat activitatea hemolitică a complementului terminal care părea să se coreleze cu expunerile la anticorpi. H4H12166P a blocat mai mult de 85% din activitatea hemolitică până în ziua 30, activitatea revenind la nivelurile de bază înainte de doză până în ziua 50. Comparatorul 1 și Comparatorul 2 au blocat aproximativ 80% activitatea hemolitică până în ziua 20 și, respectiv, în ziua 10, activitatea revenind la nivelurile inițiale până în ziua 30 pentru ambele.

25 Experimentul 2

- În acest experiment, farmacocinetica și farmacodinamia anticorpilor anti-C5 H4H12166P, H4H12161P, Comparatorul 1 și un control izotip au fost evaluate la șoareci C5 umanizați (șoareci homozigoți pentru expresia C5 umană). Nivelurile totale de C5 circulant au fost determinate utilizând un ELISA al complementului uman C5 (Abcam, cat # ab125963), care a fost efectuat conform recomandărilor producătorului. Concentrațiile medii de C5 uman la șoareci au fost determinate a fi 48,98 pg/mL ± 15,1 pg/mL.

Înainte de dozarea anticorpilor, șoarecii C5 masculi și femele umanizați au fost stratificați conform nivelurilor de C5 umane care au avut o medie de 50 pg/mL. Pentru fiecare mAb anti-C5, cohorte de cinci

șoareci au primit o singură injecție subcutanată (s.c.) de 15 mg/kg de H4H12166P, H4H12161P, Comparator 1 sau un control izotip. Toți șoarecii au primit sânge înainte de dozare, 6 ore, 1, 2, 3, 4, 7, 10, 13, 21, 30 și 45 de zile după injectare pentru analiza PK. În plus, în ziua 59, toți șoarecii din fiecare cohortă au fost eutanasiați și sângerările terminale au fost colectate pentru analiza PK și PD. Sângele a fost procesat în ser și congelat la -80 °C până a fost analizat.

Concentrațiile totale de anticorpi au fost determinate la 12 puncte de timp și activitatea de hemoliză procentuală a fost determinată la 1 moment în timpul unei perioade de viață de 59 de zile. Concentrațiile totale de anticorpi seric pentru fiecare anticorp anti-C5 sunt rezumate în Tabelul 29. Concentrația totală medie de anticorpi în funcție de profilurile de timp sunt prezentate în Figura 6. Parametrii medii PK sunt descriși în Tabelul 30.

Tabelul 29: Concentrațiile medii ale IgG totale în ser după o singură injecție subcutanată de 15 mg/kg de anticorpi anti-C5 selectați la șoarecii C5 umanizați

Ora (Ziua)	Concentrația serică de Ab (μg/mL) Medie±SD			
	H4H12166P	H4H12161P	Comparatorul 1	Controlul izotipului
0	ND	ND	ND	ND
0.25	31.2±4.2	43.5±16.3	59.2±24.1	61.5±29.4
1	149.9±16.1	193.8±24.1	179.0±9.8	218.1±17
2	160.8±20	221±26.5	166.6±22.3	188.8±25.8
3	166.2±12.4	210±31.2	159.2±33.2	177.9±26.2
Ora (Ziua)	Concentrația serică de Ab (μg/mL) Medie±SD			
	H4H12166P	H4H12161P	Comparatorul 1	Controlul izotipului
7	158.6±8.5	162.5±34.8	136.1±38.1	184.9±33.9
10	123.5±28.7	133.2±20.2	107.2±45.7	159.5±28.8
13	93.7±23.6	97.2±24.6	70.6±38	117.2±24.1
21	60.4±14.9	42.4±30.3	29.5±20.6	80.0±17.5
30	37.8±10.8	15.3±19.7	4.2±3.5	42.1±6.7
45	20.7±5.2	3.5±5.2	0.4±0.3	16.5±13.9
59	4.1±1.9	0.6±1.0	0.08±0.04	4.6±4.5
Timp = Timp în ore după injecția cu doză unică; Zi = Zi de studiu; SD = Abatere standard; SEM = Eroarea standard a mediei; ND = Nedetectat; NS = Fără probă.				

Tabelul 30: Parametrii PK

Parametru	Unități	Anticorp de testare (media ± SD)			
		H4H12166P	H4H12161P	Comparatorul 1	Controlul izotipului
C _{max}	μg/mL	178 ± 10	225 ± 22	183 ± 18	221 ± 19
AUC _{last}	d.μg/mL	3490 ± 590	3040 ± 900	2240 ± 780	4080 ± 480
t _{1/2}	D	11 ± 1	5.8 ± 2	4.2 ± 1	9.9 ± 4
C _{max} = Concentrație maximă; AUC = Aria sub curba concentrație-timp; AUC _{last} = AUC calculată de la momentul zero până la momentul ultimei concentrații pozitive; T _{1/2} = Timpul de înjumătățire estimat observat.					

Profilurile de concentrație medie față de timp arată că H4H12166P, H4H12161P, Comparatorul 1 și controlul izotipului au atins o concentrație maximă în ser (C_{max}) între zilele 1 și 3, cu valori comparabile C_{max} de 1,3 ori (178, 225, 183 μg/mL) și μg/mL, respectiv. H4H12166P și controlul izotipului au avut profiluri de eliminare similare, cu niveluri de medicament rămase de aproximativ 4 μg/mL în ziua 59. H4H12161P a prezentat o eliminare mai rapidă decât H4H12166P și un control izotip, dar a fost eliminat mai lent decât Comparatorul 1. În ziua 59, H4H12161P a avut un nivel mediu de medicament seric de 0,6 μg/mL în timp ce Comparatorul 1 a avut un nivel de medicament aproape nedetectabil de 0,08 μg/mL.

Controlul izotip, H4H12166P și H4H12161P au prezentat valori comparabile de expunere (AUC_{last}) în decurs de 1,3 ori (4080, 3490 și, respectiv, 3040 zile · μg/mL), în timp ce Comparatorul 1 a prezentat o expunere de 1,6 ori mai mică) · (2240 zile) · (2240 zile) comparativ cu H4H12166P.

Exemplul 12: Test pe bază de LC-MRM-MS pentru a determina concentrația de C5 uman total

În acest exemplu, concentrațiile serice ale C5 uman total au fost determinate utilizând o cromatografie lichidă cuplată la metoda spectrometriei de masă cu monitorizare de reacții multiple (LC-MRM-MS) într-un studiu de farmacocinetică/farmacodinamică al anticorpului anti-C5 H4H12166P.

Concentrațiile serice ale C5 uman total au fost determinate prin măsurarea concentrației unei peptide de 10 aminoacizi conținute în secvența C5 LQGTLPVEAR (aa 1129-1138 din SECV ID NR: 359) ca proxy pentru C5. Teoretic, această metodă ar putea detecta și produsul divizat C5, C5b. Cu toate acestea, din cauza instabilității C5b liber, concentrațiile C5b în ser sunt în general scăzute, majoritatea C5b fiind legate de suprafețele celulare sub formă de complexe MAC (Cooper & Muller-Eberhard 1970, J. Exp. Med. 132: 775-93 ; Hadders și colab. 2012, Cell Rep. 1: 200-7). Prin urmare, probele de ser procesate analizate aici sunt probabil să conțină doar cantități neglijabile de produs C5b, dacă există.

Metode

Pentru studiul PK/PD, șoarecii au primit o singură doză de 15 mg/kg de H4H12166P prin injecție subcutanată (s.c.). Toți șoarecii au fost sângerați înainte de dozare și la o zi după injectare pentru analiza PK. În plus, la 10, 20, 30, 40, 50 și 60 de zile după injectare, șoarecii au fost eutanasiați și au fost colectate sângeri terminale pentru analiza PK și PD.

C5 uman a fost folosit ca standard de referință pentru calibrare; și o peptidă C5 umană produsă cu un reziduu de arginină marcat cu izotop stabil C-terminal a fost utilizată ca standard intern (LQGTLPVEAR-¹³C₆¹⁵N₄). Standardul de referință a fost utilizat la concentrații cuprinse între 3,9 și 250 μg/mL (diluții în serie 1:2) în ser de la șoarecii knock-out C5 generați în casă, în care gena C5 de șoarece a fost ștearsă (C5^{-/-}). Serul de la șoarecii C5^{-/-} a fost, de asemenea, utilizat ca martor negativ (martor). Standardele de calibrare, probele martor și probele de ser de studiu (10 μL fiecare) au fost uscate și apoi au fost denaturate în 100 μL de tampon uree 8M/20mM Tris(2-carboxietil)fosfină (TCEP) la 37°C timp de 1 oră. Apoi, la toate probele s-au adăugat 10 μL de standard intern de 25 nM. Probele au fost alchilate cu 10 mM de 2-iodoacetamidă la temperatura camerei timp de 30 de minute și au fost diluate folosind bicarbonat de amoniu 50 mM până la un volum final de 500 μL. Probele au fost apoi digerate cu tripsină (1:20 g/g) peste noapte la 37°C. Peptida triptică LQGTLPVEAR derivată din C5 a fost detectată și cuantificată prin LC-MRM-MS utilizând un Waters Xevo TQ-S cu sistem ACQUITY UPLC. Fiecare probă procesată (10 μL) a fost injectată pe o coloană ACQUITY UPLC BEH C18 pre-echilibrată. Debitul a fost de 0,6 ml/min (Faza mobilă A: apă:acid formic/100:0,1 [V:V] și faza mobilă B: acetonitril:acid formic/100:0,1 [V:V]). Timpul de retenție și aria de vârf au fost determinate folosind software-ul Masslynx Analyst Data (Waters). Concentrațiile de analit C5 au fost calculate din curba de calibrare care a fost construită prin reprezentarea grafică a raportului zonei de vârf a standardului de referință C5 (peptidă C5 nemarcată LQGTLPVEAR-¹²C₆¹⁴N₄ generată de digerarea triptică a hC5) la standardul intern C5 (etichetat cu peptide marcat) la peptida C5 etichetată. concentrația nominală a standardului de referință C5. Concentrațiile au fost calculate folosind regresia liniară. Cea mai mică concentrație de standard de referință C5 (3,9 μg/mL) a fost în intervalul dinamic al testului și a fost definită ca LLOQ al testului.

Rezultate

Concentrațiile de C5 uman total în ser au fost evaluate pentru probele colectate și prin sângere din coadă înainte de dozare (predoză) și prin sângere terminală în zilele 10, 30 și 35, de la animalele corespunzătoare. Concentrațiile totale de hC5 după dozarea H4H12166P au fost similare (în interval de ~1 până la 0,9 ori) cu nivelurile de dinainte de dozare în zilele 10, 30 și 35 după administrare. Diferențele minore observate nu au fost semnificative statistic, așa cum au fost evaluate prin testul Mann-Whitney folosind software-ul GraphPad Prism. Analiza raportului molar C5/H4H12166P a demonstrat că H4H12166P a rămas în exces molar de C5 până în ziua 35 după dozare (Tabelul 31).

Tabelul 31: Rezumatul caracteristicilor PD ale H4H12166P

Ziua după doză	%CP Hemoliza Media±SD	% Inhibiție	C5 (µg/ml)			H4H12166P (µg/mL) medie ± SD	Raportul molar terminal C5: H4H12166P
			Predoză	Terminal	Fold Change		
0	77.2	0	n/d			n/a	n/a
10	5.2	93	34.2	30.0	1.0	78.8	0.3
30	7.4	90	31.9	28.4	0.9	30.4	0.8
35	6.0	92	36.1	32.7	1.0	29.6	0.9
40	37.1	52	n/d			20.9	n/d
50	Toate animalele din grup sunt excluse din cauza titrurilor MAHA > 1000						
60	73.57	5	n/d			5.9	n/d

^aProcentul de inhibare a activității hemolitice CP a fost calculat din valorile medii % ale hemolizei CP în ziua indicată după dozare în raport cu valoarea medie % a hemolizei CP în ziua 0.

^bFold Change = terminal (ziua indicată după dozare) C5: predoză C5.

SD = abaterea standard; MAHA = anticorp anti-uman de șoarece; n/d = nedeterminat. Animalele cu date afectate de MAHA au fost complet excluse din calcule (2x ziua 30, 1x ziua 35, 2x ziua 40 și toți cei 4 șoareci în ziua 50)

Exemplul 13: Maparea epitopului a legării H4H12166P la C5 prin schimb de hidrogen/deuteriu

Maparea epitopului de schimb H/D cu spectrometrie de masă a fost efectuată pentru a determina resturile de aminoacizi ale hC5 [(aminoacizi M1-C1676 din SECV ID Nr: 359) cu care interacționează H4H12166P. O descriere generală a metodei de schimb H/D este prezentată, de exemplu, în Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267(2):252-259; și Engen și Smith (2001) Anal. Chim. 73:256A-265A.

Experimentele HDX-MS au fost efectuate pe o platformă integrată Waters HDX/MS, constând dintr-un sistem Leaptac HDX PAL pentru etichetarea deuteriului, un Waters Acquity M-Class (Manager de solvent auxiliar) pentru digestia și încărcarea probei, un Waters Acquity M-Clasa (μ Binary solvent manager) pentru gradientul coloanei analitice și spectrometrul de masă Synapt G2-Si pentru măsurarea masei peptidice peptice.

Soluția de marcarea a fost preparată în tampon PBS 10 mM în D₂O la pD 7,0 (echivalent cu pH 6,6). Pentru marcarea cu deuteriu, 3,8 μ L de C5 (6 pmol/ μ L) sau C5 preamestecat cu anticorpul în raport molar 1:1 au fost incubati cu 56,2 μ L soluție de marcarea D₂O pentru diferite momente (de exemplu, control neutrat = 0 sec, marcat pentru 1 min și 20 min). Deuterarea a fost stinsă prin transferul a 50 μ L de probă la 50 μ L tampon de stingere prerăcit (0,2 M TCEP, 6 M clorură de guanidină în 100 mM tampon fosfat, pH 2,5) și proba amestecată a fost incubată la 1,0 °C timp de două minute. Proba stinsă a fost apoi injectată într-un Waters HDX Manager pentru digestia online pepsină/protează XIII. Peptidele digerate au fost prinse pe o precoloană VanGuard ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 μ m, 2,1 $\times$ 5 mm la 0°C și eluate într-o coloană analitică ACQUITY UPLC BEH C18 1,7- μ m, 1,0 $\times$ 50 mm timp de 9 minute. separare în gradient de 5%-40% B (faza mobilă A: 0,1% acid formic în apă, faza mobilă B: 0,1% acid formic în acetonitril). Spectrometrul de masă a fost setat la o tensiune conică de 37 V, un timp de scanare de 0,5 s și un interval de masă/încărcare de 50-1700 de unități Thomson (Th).

Pentru identificarea peptidelor din C5 uman, datele LC-MS^E din eșantionul neutrat au fost procesate și căutate în baza de date, inclusiv C5 umană, pepsină și secvența lor randomizată prin intermediul software-ului Waters ProteinLynx Global Server (PLGS). Peptidele identificate au fost importate în software-ul DynamX și filtrate după două criterii: (1) produse minime per aminoacid = 0,3 și (2) pragul fișierului de replicare = 3. Software-ul DynamX a determinat apoi automat absorbția de deuteriu a fiecărei peptide, pe baza timpului de retenție și a preciziei înalte a masei (<10 ppm) în mai multe momente de timp cu 3 replici de fiecare dată.

Folosind coloana online pepsină/protează XIII cuplată cu achiziția de date MS^E, au fost identificate un total de 189 de peptide din C5 uman în absența sau prezența anticorpului, reprezentând o acoperire de secvență de 62%. Cinci peptide au redus semnificativ absorbția de deuteră (valori delta centroid > 0,9 daltoni cu valori p < 0,05) atunci când s-au legat la H4H12166P și sunt ilustrate în Tabelul 32.

Tabelul 32: Deuterarea peptidelor C5 umane la legarea la H4H12166P

Reziduuri	1 minut Deuterare			20 min Deuterare		
	C5 Centroid H ⁺	C5+H4H12166P Centroid MH ⁺	Δ	C5 Centroid MH ⁺	C5+H4H12166P Centroid MH ⁺	Δ
591-599	1015.38 $\pm$ 0.09	1014.44 $\pm$ 0.16	-0.93	1015.64 $\pm$ 0.04	1014.60 $\pm$ 0.08	-1.04
593-599	769.41 $\pm$ 0.11	768.33 $\pm$ 0.05	-1.08	769.65 $\pm$ 0.01	768.30 $\pm$ 0.004	-1.35
775-787	1693.81 $\pm$ 0.11	1692.85 $\pm$ 0.07	-0.96	1694.06 $\pm$ 0.04	1692.96 $\pm$ 0.02	-1.10
775-794	2439.62 $\pm$ 0.29	2438.42 $\pm$ 0.20	-1.20	2440.16 $\pm$ 0.06	2439.17 $\pm$ 0.21	-0.99
779-787	1141.14 $\pm$ 0.04	1140.21 $\pm$ 0.05	-0.93	1141.23 $\pm$ 0.03	1140.21 $\pm$ 0.02	-1.02

Masa peptidei înregistrată corespunde valorii medii a masei centroidului MH⁺ din trei replici. Aceste peptide, corespunzând aminoacizilor 591-599 și 775-794, au avut o rată de deuterare mai lentă la legarea la H4H12166P. Aceste reziduuri identificate corespund, de asemenea, resturilor 591-599 și 775-794 ale C5 umane, așa cum sunt definite de intrarea Uniprot P01031 (CO5_HUMAN; SECV ID NR: 359).

Exemplul 14: Efectul anticorpilor anti-C5 asupra inflamației oculare în uveita autoimună experimentală la șoareci

Prezentul studiu a fost întreprins pentru a evalua rolul C5 în uveita autoimună experimentală (EAU). Au fost utilizate atât abordări genetice [C5 knockout (KO), șoareci C3/C5 dublu KO], cât și abordări experimentale farmacologice (anticorp anti-C5).

Metode

S-au folosit șoareci adulți C57BL/6J (n=25, Jackson labs), șoareci C5 KO (n=13) și C3/C5 KO (n=8) (Regeneron Pharmaceuticals Inc.). EAU a fost indusă prin injectarea subcutanată a peptidei proteice

de legare a retinoidului interfotoreceptor uman (IRBP, New England Peptide) în adjuvant complet Freund și injectare intraperitoneală de toxină pertussis. mAb C5 anti-șoarece sau mAb de control izotip a fost administrat prin injecții subcutanate la fiecare 3 zile, din ziua 5 până în ziua 28.

Anticorpul C5 anti-șoarece utilizat în acest studiu (M1M17628N) a cuprins un HCVR/LCVR cu SEQ ID NR: 362/363. SPECTRALIS® HRA+OCT (Heidelberg Engineering, Inc.) a fost folosit pentru a evalua nivelurile de inflamație în zilele -1, 7, 14, 21 și 28. Toate animalele au fost eutanasiate în ziua 28 pentru recoltarea ochilor și a sângelui. Testul de hemoliză cu/fără C3 uman a fost efectuat pentru a valida inhibarea complementului. Datele au fost analizate prin ANOVA.

Rezultate

Comparativ cu șoarecii de tip sălbatic, apariția inflamației (30-50%) și numărul de celule vitroase au scăzut semnificativ la șoarecii C5 KO ($p<0,01$). Scorurile tomografiei cu coerență optică (OCT) la șoarecii C5 KO au redus, de asemenea, semnificativ cu 50% în săptămâna 3 ($p<0,0001$). Interesant, la șoarecii C3/C5 dublu KO, au existat semnificativ mai multe grupuri de celule vitroase și scoruri mai mari ale bolii în ziua 28, comparativ cu șoarecii de tip sălbatic ($p<0,05$). La animalele care au primit anti-mC5 Ab (50 mg/kg), incidența inflamației și aglomerările de celule vitroase au fost semnificativ mai mici în comparație cu grupul fără tratament sau izotip în ziua 21 ($p<0,01$). În săptămânile 3 și 4, scorurile OCT în grupul tratat cu anticorpi anti-C5 au fost semnificativ mai mici în comparație cu niciun tratament sau control izotip ($p<0,0001$). (Figura 7) Testele de hemoliză cu/fără C3 uman au confirmat efectul de inhibare al anticorpului anti-C5 în săptămâna 4 (Figura 8).

Concluzie

Inflamația oculară datorată EAU a fost atenuată prin inhibarea activității C5, fie prin ștergere genetică, fie prin inhibare farmacologică cu un anticorp specific anti-C5. Depleția C5 a întârziat apariția EAU și a redus scorul bolii OCT. Aceste rezultate indică faptul că C5 este o potențială țintă terapeutică pentru uveita autoimună. Anticorpul anti-C5 are efect protector asupra bolii EAU la șoarecii de tip sălbatic. Descoperirile noastre sugerează, de asemenea, că C3 ar putea fi benefic pentru boala EAU la șoareci.

Exemplul 15: Efectul anticorpilor anti-umani C5 asupra uveitei autoimune experimentale

Acest exemplu descrie efectele anticorpilor anti-C5 împotriva C5 uman într-un model de șoarece de uveită autoimună experimentală (EAU). Șoarecii utilizați pentru acest studiu au fost umanizați pentru a exprima proteina umană C5 folosind tehnologia Velocigene® (Valenzuela și colab. 2003, Nat. Biotehnologia. 21: 652-659). Șoarecii umanizați au fost modificați pentru a înlocui exonul 2 prin exonul 41 al genei C5 murine cu exonii 2 - 42 ai genei C5 umane (dezvăluți în Publicația cererii de brevet US 2015/0313194, încorporată aici în întregime).

Metode

Șoarecii masculi adulți au fost imunizați subcutanat în fiecare coapsă cu 150 pg de peptidă 1-20 (GPTHFLFQPSLVLDMAKVLLD) de proteină de legare a retinoidului interfotoreceptor uman (IRBP) (SECV ID NR: 364) (Avichezer și colab. 2000, Invest. Oftalmol. Vis. Sci. 41:127-131) în 0,2 ml emulsie de CFA, suplimentată cu Mycobacterium tuberculosis tulpina H37RA la 2,5 mg/ml. Șoarecii au fost apoi inoculați intraperitoneal cu 1,0 pg de toxină pertussis (PTX) pentru a facilita inducerea autoimunității mediate de celule prin promovarea unei polarizări Th1 a răspunsului imun (Thurau și colab. 1997, Clin. Exp. Immunol. 109: 370-376; Silver et al 1999, Invest. Oftalmol. Vis. Sci. 40: 2898-2905). Greutățile corporale ale animalelor au fost monitorizate de două ori pe săptămână.

Examenle oftalmice au fost efectuate în ziua -1, înainte de inducția EAU și în zilele 7, 14, 21 și 28. Șoarecii au fost anesteziați cu ketamina (120 mg/kg, IP) și xilazină (5 mg/kg, IP). Pupilele au fost dilatate folosind o soluție oftalmică 0,5% de Tropicamide, iar fundul ochiului a fost examinat folosind o lentilă de contact cu o cameră pentru fundul de ochi într-o platformă de angiografie retiniană Spectralis Heidelberg (HRA) + sistem OCT (Heidelberg Engineering, Carlsbad, CA, SUA).

O serie de 61 de secțiuni optice laterale au fost obținute pentru fiecare ochi folosind funcția OCT pe sistemul Spectralis HRA + OCT (Heidelberg Engineering, Carlsbad, CA, SUA). Zona de imagistică OCT a fost centrată pe discul optic, permițând imagini egale deasupra și sub capul nervului optic. Grosimea retinei a fost măsurată ca distanța dintre partea inferioară a stratului RPE și membrana limitatoare interioară a ochiului. Măsurătorile au fost luate la 1500 μm de pe discul optic, iar valorile din 4 cadrane retiniene diferite (de exemplu, superior, inferior, temporal și nazal) au fost mediate pentru o grosime medie a retinei a ochiului.

Severitatea infiltrării celulelor inflamatorii în vitros a fost, de asemenea, gradată în imagini OCT, prin evaluarea numărului mediu de grupuri de celule inflamatorii în vitros, în patru scanări OCT laterale care au transectat nervul optic, per ochi.

A fost dezvoltată o scară de 4 puncte pentru evaluarea severității bolii în imaginile OCT (Scoruri OCT) (Tabelul 33).

Tabelul 33: Notarea EAU *in vivo* utilizând tomografia cu coerență optică (OCT)

Nota	Criterii
0	Nicio schimbare
0.5 (Urmă)	Infiltrație minoră de celule inflamatorii în vitros, în principal în apropierea capului nervului optic (<15 clustere)
1	Infiltrație celulară inflamatorie minoră în vitros, în principal în apropierea capului nervului optic (<25 clustere); leziuni subretiniene focale minore (pete gri) la periferie; pliuri minore ale retinei la periferie; dilatarea vasculară a retinei; perivasculita și vasculita
2	Infiltrarea moderată a celulelor inflamatorii în vitros mai difuză, dar nu în periferia îndepărtată (<50 clustere); perturbări ale stratului retinian; formațiuni de granulom de dimensiuni mici până la mijlocii cu pliuri retiniene în primul rând la periferie; dilatarea vaselor; neovascularizare coroidiana focală minoră; perivasculită și vasculită; edem minor retinian (<10 μ m)
3	Infiltrare difuză moderată până la severă a celulelor inflamatorii în vitros (>50 clustere); perturbări difuze ale stratului retinian și vase dilatate în stratul nuclear interior; formațiuni de granulom mediu până la mare cu pliuri retiniene în toată retina; dilatarea vasculară retiniană severă; perivasculită și vasculită; neovascularizare coroidală difuză moderată; edem retinian moderat până la sever (10-40 μ m); dezlipiri minore de retina
4	Infiltrație severă difuză de celule inflamatorii în vitros (>70 clustere); perturbări ale stratului difuz și vase dilatate în stratul nuclear interior; formare severă de granulom difuz cu pliuri retiniene; neovascularizare coroidală difuză severă; perivasculită și vasculită; degenerare retiniană sau edem sever al retinei (pierdere >20 μ m sau, respectiv, câștig >40 μ m); dezlipiri mari de retina

Analize statistice

Analizele statistice pentru datele parametrice (greutatea corporală, grupurile de celule inflamatorii în vitros și grosimea retinei) au fost efectuate prin testul ANOVA unidirecțional și testul de comparație multiplă Tukey. Pentru datele neparametrice (scoruri OCT și scoruri histologice) analizele au fost efectuate prin testul Kruskal-Wallis și testul Dunn cu software-ul GraphPad Prism versiunea 5.0d în raport cu grupurile de control izotip sau fără tratament. Datele arată valori medii $\pm$ SEM. O valoare p mai mică de 0,05 a fost considerată semnificativă statistic.

Rezultate

Într-un prim studiu (Studiul A), șoarecii au fost tratați subcutanat la fiecare 3 zile din ziua 5 cu anticorp de control izotip (50 mg/kg) sau 10 mg/kg sau 50 mg/kg de H4H12170P. Tratamentul cu 10 mg/kg H4H12170P a dus la o reducere a inflamației și a leziunilor retinei (Figura 9). Șoarecii tratați cu 10 mg/kg H4H12170P au prezentat, de asemenea, o reducere semnificativă statistic a scorurilor OCT în ziua 21 și ziua 28 (Figura 10).

Într-un al doilea studiu (studiul B), șoarecii au fost tratați subcutanat la fiecare 3 zile din ziua 6 fie cu izotip de control (10 mg/kg), 3 mg/kg sau 10 mg/kg de H4H12166P, fie cu Comparatorul 2 (vezi Exemplul 2 aici „Constructuri de control utilizate în următoarele exemple”). Tratamentul cu H4H12166P fie la 3 mg/kg, fie la 10 mg/kg a produs o reducere legată de doză a scorurilor OCT care a fost semnificativă statistic în zilele 14 până la 28 (Figura 11). Tratamentul cu 10 mg/kg H4H12166P la șoareci umanizați C5 începând cu 6 zile după inducerea EAU a dus la o reducere legată de doză a inflamației și a leziunii retinei, așa cum s-a determinat prin OCT obținut în zilele 14 până la 28 (Figura 12).

Pentru ambele studii, evaluarea neinvazivă în timpul vieții prin OCT a arătat o dezvoltare progresivă a inflamației, creșterea grosimii retinei și anomalii morfologice la animalele martor după imunizarea cu IRBP.

Concluzie

Aceste experimente oferă dovezi farmacologice suplimentare că C5 joacă un rol în patogeniza uveitei autoimune. Epuizarea farmacologică a C5 umană de către anticorpii C5 anti-umani complet umani a amânat incidența EAU și a redus severitatea bolii, stabilind eficacitatea acestor anticorpi în uveita autoimună.

Exemplul 16: Efectul anticorpilor anti-C5 asupra afectării ischemiei-reperfuziei renale

Prezentul studiu a fost realizat pentru a evalua rolul C5 în leziunea de ischemie-reperfuzie renală. Au fost utilizate atât abordări genetice (folosind șoareci knockout C3 și C5), cât și farmacologice (folosind anticorpi anti-C5). Modelul de ischemie-reperfuzie a fost indus prin clamparea bilaterală a pediculului renal timp de 45 de minute, urmată de 48 de ore de reperfuzie. Laparotomia simulată a servit drept controale. Anticorpul anti-C5 a fost administrat la 50 mg/kg intravenos ca doză unică imediat după ischemie (curativ); sau subcutanat în două doze, ziua -1 și intervenția chirurgicală în ziua 1 (preventivă). Anticorpul anti-C5 utilizat pentru acest studiu a fost M1M17628N cuprinzând HCVR/LCVR cu SECV ID NR: 362/363. Azotul

ureic din sânge (BUN) și markerii creatininei serice au fost utilizați pentru a evalua nivelurile de boală și protecție la șoareci.

Tabelul 34: Modificarea procentuală a nivelurilor de azot din ureea din sânge la șoarecii tratați cu anticorp anti-C5 (M1M17628N) în moduri preventive și terapeutice

BUN, % modificare vs.	RIRI + Veh	RIRI + Iso. Ctl
	Ziua 2	Ziua 2
RIRI + M1M17628N (anterior)	-37.19	-34.68
RIRI + M1M17628N (Cur)	- 53.70	-51.85

5 **Tabelul 35: Modificarea procentuală a nivelurilor de creatinine serice la șoarecii tratați cu anticorp anti-C5 (M1M17628N) în moduri preventive și terapeutice**

SCr, % schimbare vs.	RIRI + Veh	RIRI + Iso. Ctl
	Ziua 2	Ziua 2
RIRI + M1M17628N (anterior)	-53.09	-49.34
RIRI + M1M17628N (Cur)	-59.40	-56.16

10 În comparație cu șoarecii de tip sălbatic, șoarecii knockout C3 și C5 au arătat o protecție funcțională semnificativă în modelul RIRI de leziuni renale acute, așa cum este evidențiată prin reducerea nivelului de azot ureic din sânge și a nivelurilor de creatinine serice. Anticorpul anti-C5 a arătat protecție funcțională în modelul RIRI atât în mod preventiv cât și în mod terapeutic (Tabelele 34-35).

Exemplul 17: Efectul anticorpilor anti-C5 asupra nefritei lupice

Acest exemplu descrie eficacitatea anticorpilor anti-C5 în tratarea nefritei lupice la un model de șoarece.

15 Lupusul eritematos sistemic (LES) este o afecțiune autoimună cauzată de pierderea toleranței la auto-antigene, producerea de autoanticorpi și depunerea de complexe imune (IC) fixatoare de complement în țesuturile lezate. LES se caracterizează printr-o gamă largă de manifestări clinice și organe vizate, nefrita lupică fiind una dintre cele mai grave complicații. Activarea complementului în rinichii pacienților cu nefrită lupică contribuie la inflamație și la deteriorarea țesuturilor. Eficacitatea anticorpilor anti-C5 în
20 tratarea nefritei lupice a fost studiată la șoareci NZBWF1, un model de șoarece spontan al nefritei lupice (Yang și colab. 1996, PNAS). Șoarecii dezvoltă boală autoimună asemănătoare cu LES uman, autoanticorpi la antigenele nucleare și proteinele membranei celulare, hipergammaglobulinemie, albuminurie, proteinurie, inițiază glomerulonefrita complexului imun și mor din cauza insuficienței renale și a bolii renale în stadiu terminal la vârsta de 35 până la 50 de săptămâni.

25 Pentru acest studiu, șoarecii NZBWF1 în vârstă de 25 de săptămâni au fost tratați subcutanat cu 30 mg/kg de control izotip sau anticorpi anti-C5 de două ori pe săptămână timp de 8 săptămâni urmate de trei ori pe săptămână timp de 10 săptămâni. Anticorpii C5 anti-șoarece utilizați pentru acest studiu au fost M1M17628N și M1M17627N, cuprinzând HCVR/LCVR cu SEQ ID NR: 362/363 și, respectiv, 365/366.

30 Tratamentul cu anticorpi anti-C5 a îmbunătățit semnificativ rata de supraviețuire la șoareci (Figura 13). Ambii anticorpi au îmbunătățit albuminuria la 8-14 săptămâni de tratament (Figura 14) și nivelurile de azot din ureea din sânge la 12-16 săptămâni de tratament (Figura 15).

Exemplul 18: Efectul anticorpilor anti-C5 împotriva morții celulelor astrocitelor

35 Neuromielita optică (NMO) este o boală autoimună a sistemului nervos central (SNC) care afectează în principal nervul optic și măduva spinării. În NMO, autoanticorpii anti-aquaporin-4 (AQP4-Ab) provoacă leziuni astrocitelor prin activarea citotoxicității dependente de complement (CDC). Scopurile acestui studiu au fost de a evalua rolul sistemului complement în progresia NMO și utilizarea unui anticorp împotriva unei proteine din complement ca potențial tratament terapeutic pentru NMO.

Astroците corticale primare de șobolan au fost obținute din cortexul cerebral al puilor de șobolan post-natali și au fost cultivate cu AQP4-Ab (anticorp „rAb-53” din Publicarea cererii de brevet SUA 2014/0170140; Bennett și colab. 2009, Ann.

40 Neurol. 66: 617-629) și proteinele complement pentru a demonstra citotoxicitatea mediată celular. Apoi experimentele au fost repetate cu adăugarea unui anticorp anti-C5 pentru a demonstra blocarea distrugerii celulelor astrocitelor.

45 Pentru a cuantifica moartea celulară, a fost efectuat un test de citotoxicitate a luminiscentei CytoTox-Glo™. Testul a folosit diferite concentrații de anticorp anti-C5 (0,001 pg/ml, 0,01 pg/ml, 0,1 pg/ml, 1 pg/ml, 10 pg/ml, 100 pg/ml sau 1000 pg/ml) sau un anticorp de control izotip.

50 Pentru a determina dacă anticorpul anti-C5 ar putea bloca CDC indus de AQP4-Ab, astroцитеle au fost placcate și testul de citotoxicitate CytoTox-Glo™ a fost repetat pentru a găsi o doză optimă de AQP4-Ab pentru placa respectivă. Concentrația optimă de AQP4-Ab a fost de 50 pg/mL, iar într-un experiment următor a fost utilizată o doză constantă de AQP4-Ab (50 pg/mL), în timp ce doza de anticorp anti-C5 a fost variată. După cum se arată în Figura 16, s-a observat o scădere a RLU (în medie de la 300k la în medie 100k) cu cantități crescânde de anticorp anti-C5 demonstrând că anticorpul anti-C5 a blocat moartea

celulelor astrocitelor. Pentru ambele experimente, RLU nu a variat cu anticorpul de control izotip. După cum se arată în Figura 16, anticorpii anti-C5 au inhibat citotoxicitatea indusă de AQP4 Ab pe astrocitul cortical primar cu IC50 de 15-17 nM.

Într-un studiu ulterior, anticorpul anti-AQP4 și anticorpul anti-C5 vor fi injectați în creierul de șobolan pentru a evalua eficacitatea terapeutică împotriva citotoxicității mediate de complement a astrocitelor din SNC.

Exemplul 19: Test endotelial

Acest exemplu descrie un test endotelial glomerular *in vitro* pentru a examina dacă anticorpii anti-C5 blochează depunerea C5b-9 și C3.

Metodele reproductibile pentru evaluarea efectelor inhibitoare ale candidaților medicamente asupra activării complementului sunt esențiale pentru dezvoltarea preclinică. Datorită complexității căilor de activare a complementului, un test ar trebui să utilizeze celule și puncte finale relevante pentru indicația terapeutică dată. Aici, folosind o linie celulară endotelială glomerulară umană imortalizată (HGEC), a fost validat un model de depunere C3 și C5 complementar pentru utilizare evaluând activitatea de blocare a mAb-urilor anti-C3 sau C5.

Metode

Celulele endoteliale glomerulare ale rinichiului primar uman (HGEC; Cell Biologics) au fost placcate peste noapte în mediu complet în plăci cu 96 de godeuri, acoperite cu collagen I, cu fund transparent negru. Celulele au fost tratate fie cu PBS (martor), fie activate timp de 10 minute cu 10 uM ADP. După spălarea cu PBS, s-a adăugat ser uman 50% (conservat în complement, epuizat în C3 sau epuizat în C5) timp de 4 ore. Anticorpii anti-C5 au fost adăugați la 1 mg/ml la ser înainte de tratament. Celulele au fost spălate și fixate și testate cu anticorpi anti-C3b (Thermofisher) și/sau anticorpi anti-C5b-9 (Abcam), anticorpi secundari și contracolorate cu DAPI. Imaginile au fost capturate pe ImagExpress și analiza de imagini cu conținut ridicat a fost utilizată pentru a cuantifica colorarea fluorescență pentru fiecare imagine și a fost mediată pe condiție.

Rezultate

Depunerea C3 și C5b-9 a fost observată pe HGEC-uri activate cu ADP expuse la ser uman normal, dar nu și pe HGEC-uri neactivate (C3: $1,5 \times 10^7 \pm 1,0 \times 10^7$; C5: $7,9 \times 10^6 \pm 6,6 \times 10^6$, $P < 0,05$ față HGEC neactivat de ADP). Depunerea de C3 și C5b-9 a fost redusă semnificativ pe HGEC activat cu ADP expus la serul epuizat C3 sau C5 (C3: $3,3 \times 10^5 \pm 4,8 \times 10^4$; C5: $1,5 \times 10^6 \pm 6,0 \times 10^6$, $P < 0,05$. Adăugarea unui mAb anti-C5 de blocare a redus semnificativ depunerea C5b-9 derivată din ser uman normal pe HGEC activat cu ADP, depunerea a fost comparabilă cu serurile epuizate C5 (mAb C5: $1,02 \times 10^6 \pm 6,0 \times 10^5$, Control mAb $3,3 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^6$, $P < 0,05$ față de mAb de control).

Concluzie

Aceste date demonstrează utilitatea unui test endotelial glomerular uman *in vitro* pentru a modela depunerea complementului C3 și C5. În plus față de screening-ul *in vitro*, acest test oferă potențial ca model translațional pentru a evalua strategiile anti-complement în boala renală folosind probe de ser derivate de la pacient.

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- EDWIN K.S. WONG ET AL: "Anticomplement C5 therapy with eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and atypical hemolytic uremic syndrome", TRANSLATIONAL RESEARCH, vol. 165, no. 2, 1 February 2015 (2015-02-01), pages 306-320, XP055358380, NL ISSN: 1931-5244, DOI: 10.1016/j.trsl.2014.10.010
- EP-B1- 2 328 616
- WO-A1-2014/047500
- Vered Kunik ET AL: "Structural Consensus among Antibodies Defines the Antigen Binding Site", PLoS Computational Biology, vol. 8, no. 2, 23 February 2012 (2012-02-23), page e1002388, XP055123186, DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002388

(57) Revendicări:

1. Un anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia care se leagă în mod specific la proteina factorului complementar 5 (C5), în care anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu (HCVR) care cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 98 și o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR) care cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 106.

2. Anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia conform revendicării 1, cuprinzând un lanț greu și un lanț ușor, în care lanțul greu cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 353 și/sau lanțul ușor cuprinde setul de secvențe de aminoacizi mai departe în SECV ID NR: 354.

3. Anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia conform revendicării 1 sau revendicării 2, cuprinzând un lanț greu și un lanț ușor, în care lanțul greu cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 353, iar lanțul ușor cuprinde aminoacidul secvența prezentată în SECV ID NR: 354.

4. Anticorpul sau fragmentul acestuia de legare la antigen conform oricăreia dintre revendicările 1-3, care este o moleculă de anticorp complet.

5. O compoziție farmaceutică care cuprinde un anticorp sau un fragment al acestuia de legare la antigen conform oricăreia dintre revendicările 1-4 și un purtător sau diluant acceptabil farmaceutic.

6. Un dispozitiv de livrare a stiloului injector (pen) reutilizabil care cuprinde compoziția farmaceutică conform revendicării 5.

7. Un dispozitiv de eliberare cu autoinjector care cuprinde compoziția farmaceutică conform revendicării 5.

8. O moleculă de polinucleotidă izolată care cuprinde o secvență de nucleotide care codifică o HCVR a unui anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1-4 și o secvență de nucleotide care codifică o LCVR a unui anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia ca prezentat în oricare dintre revendicările 1-4.

9. Un vector de expresie recombinant care cuprinde molecula de polinucleotidă conform revendicării 8.

10. O celulă care cuprinde vectorul de expresie recombinant conform revendicării 9.

11. Anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1-4 pentru utilizare într-o metodă de prevenire, tratare sau ameliorare a cel puțin unui simptom sau indicație a unei boli sau tulburări selectate din grupul constând din sindromul hemolitic uremic atipic (aHUS), hemoglobinurie paroxistică nocturnă (PNH), degenerescență maculară legată de vârstă, atrofie geografică, uveită, neuromielita optică, scleroză multiplă, accident vascular cerebral, sindrom Guillain Barre, leziuni cerebrale traumatiche, boala Parkinson, o tulburare de activare inadecvată sau nedorită a complementului, o complicație a hemodializei, respingere hiperacută a alogrefei, respingere a xenogrefei, toxicitate indusă de interleukină-2 în timpul terapiei cu IL-2, o afecțiune inflamatorie, inflamația unei boli autoimune, boala Crohn, sindromul de detresă respiratorie a adultului,

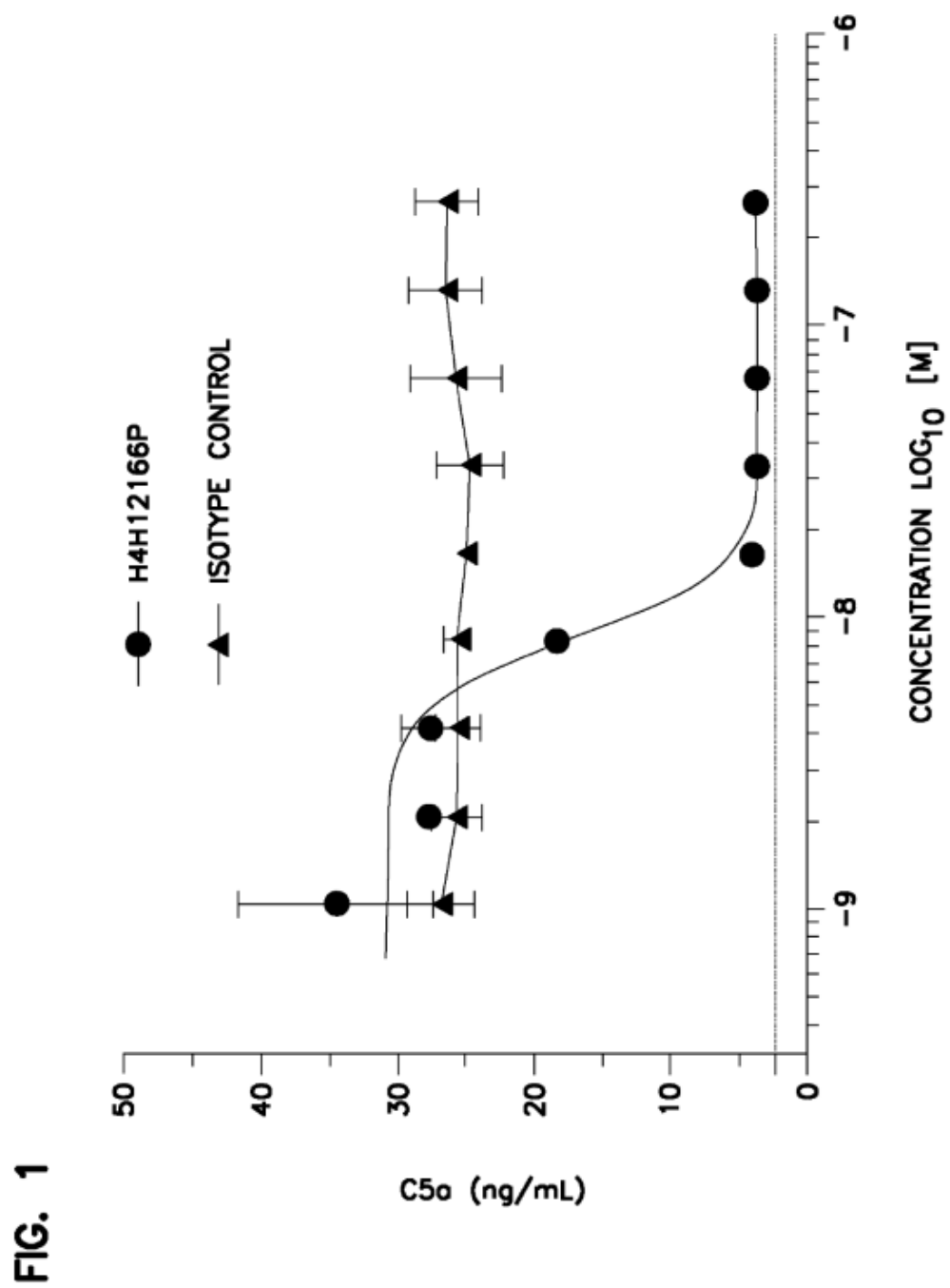
leziune termică, o arsură, degerături, o stare post-ischemică de reperfuzie, infarct miocardic, sindrom de scurgere capilară, obezitate, diabet, boala Alzheimer, schizofrenie, epilepsie, ateroscleroză, vasculite, pemfigoid bulos, glomerulopatie C3, glomerulonefrită proliferativă membranară, nefropatie diabetică, sindromul Alport, insuficiență renală progresivă, o boală proteinurică a rinichilor, leziune renală ischemie-reperfuzie, nefrită lupică, angioplastie cu balon, sindrom post-pompă în bypass cardiopulmonar sau bypass renal, ischemie renală, reperfuzie a arterei mezenterice după reconstrucție aortică, boală infecțioasă, sepsis, o tulburare a complexului imun, o boală autoimună, o afecțiune renală, artrita reumatoidă, lupus eritematos sistemic (LES), nefrita LES, nefrita proliferativă, anemie hemolitică, astm, boala pulmonară obstructivă cronică (BPOC), emfizem, embolie pulmonară, infarct pulmonar, pneumonie și miastenia gravis.

12. Anticorpul sau fragmentul acestuia de legare la antigen pentru utilizare conform revendicării 11, în care:

(a) metoda de tratament este profilactică;

(b) metoda cuprinde administrarea anticorpului sau a fragmentului de legare la antigen al acestuia în combinație cu un al doilea agent terapeutic; opțional, în care al doilea agent terapeutic este selectat din grupul constând dintr-un anticoagulant, un medicament antiinflamator, un antihipertensiv, un agent imunosupresor, un agent de scădere a lipidelor, un agent anti-CD20 cum ar fi rituximab, un agent anti-TNF cum ar fi ca infliximab, un agent anti-convulsii, un inhibitor C3, un al doilea anticorp anti-C5 și un agent anti-trombotic; sau

(c) metoda cuprinde administrarea anticorpului sau a fragmentului de legare la antigen al acestuia subcutanat, intravenos, intradermic, intraperitoneal, oral, intramuscular sau intracranian.



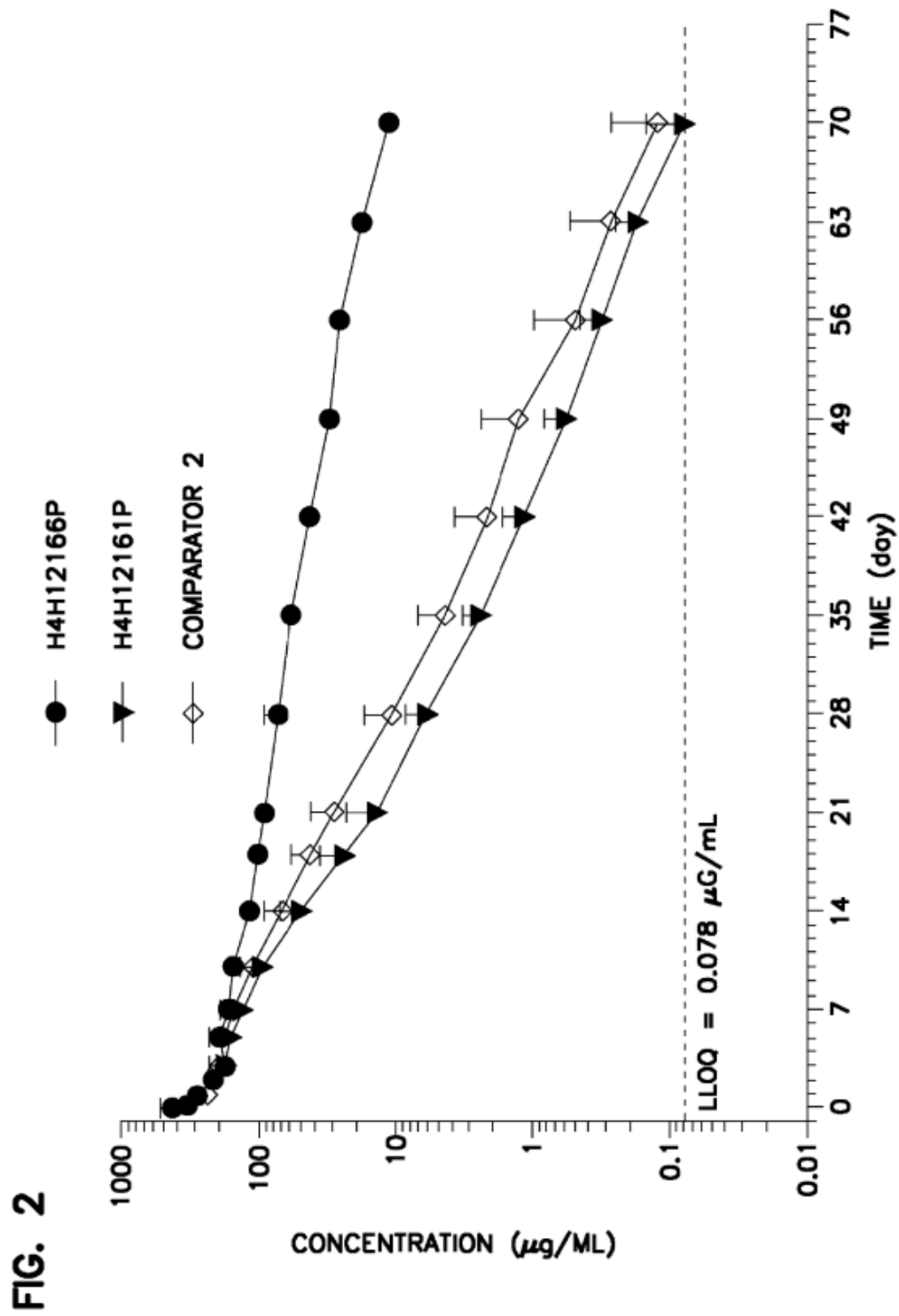
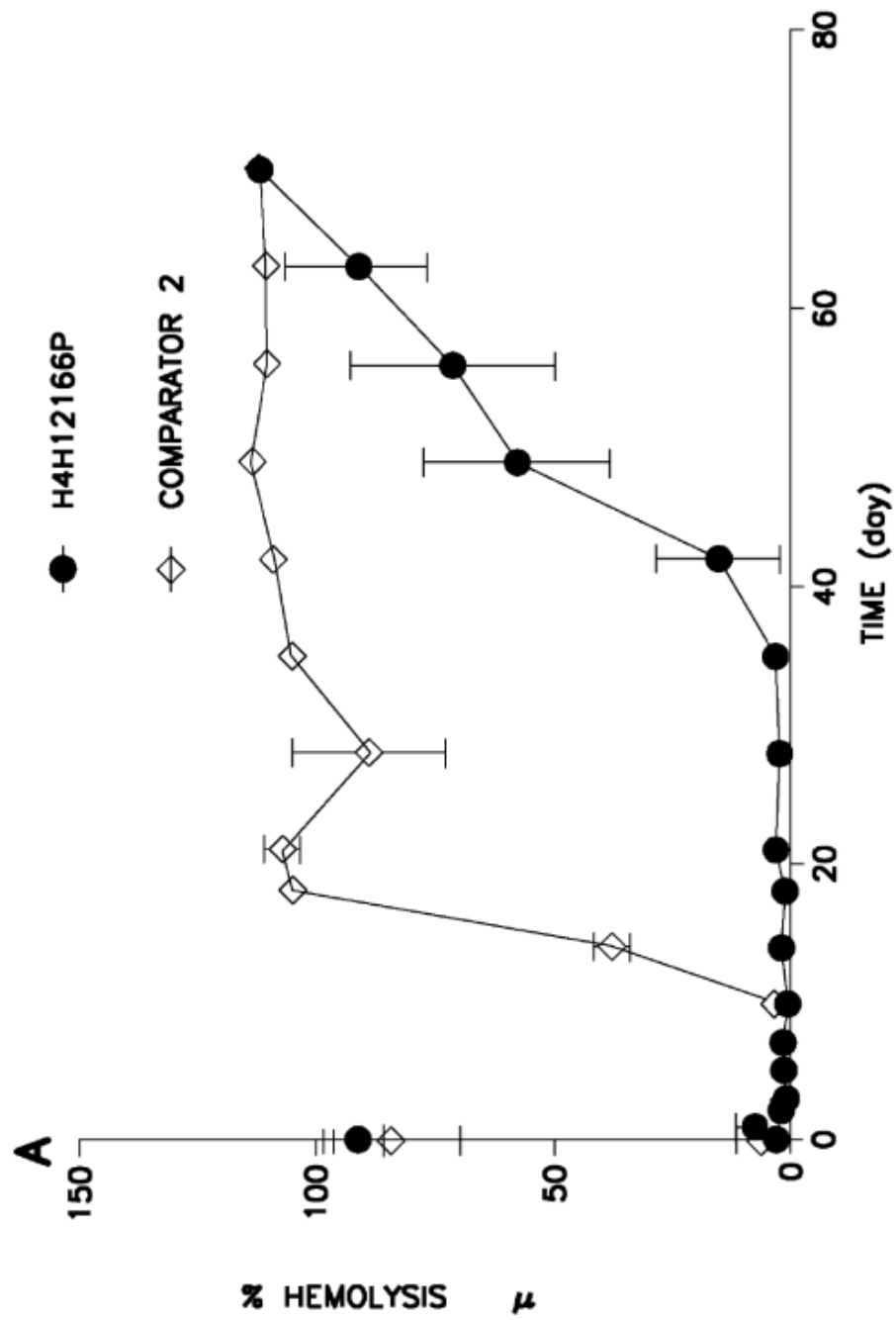
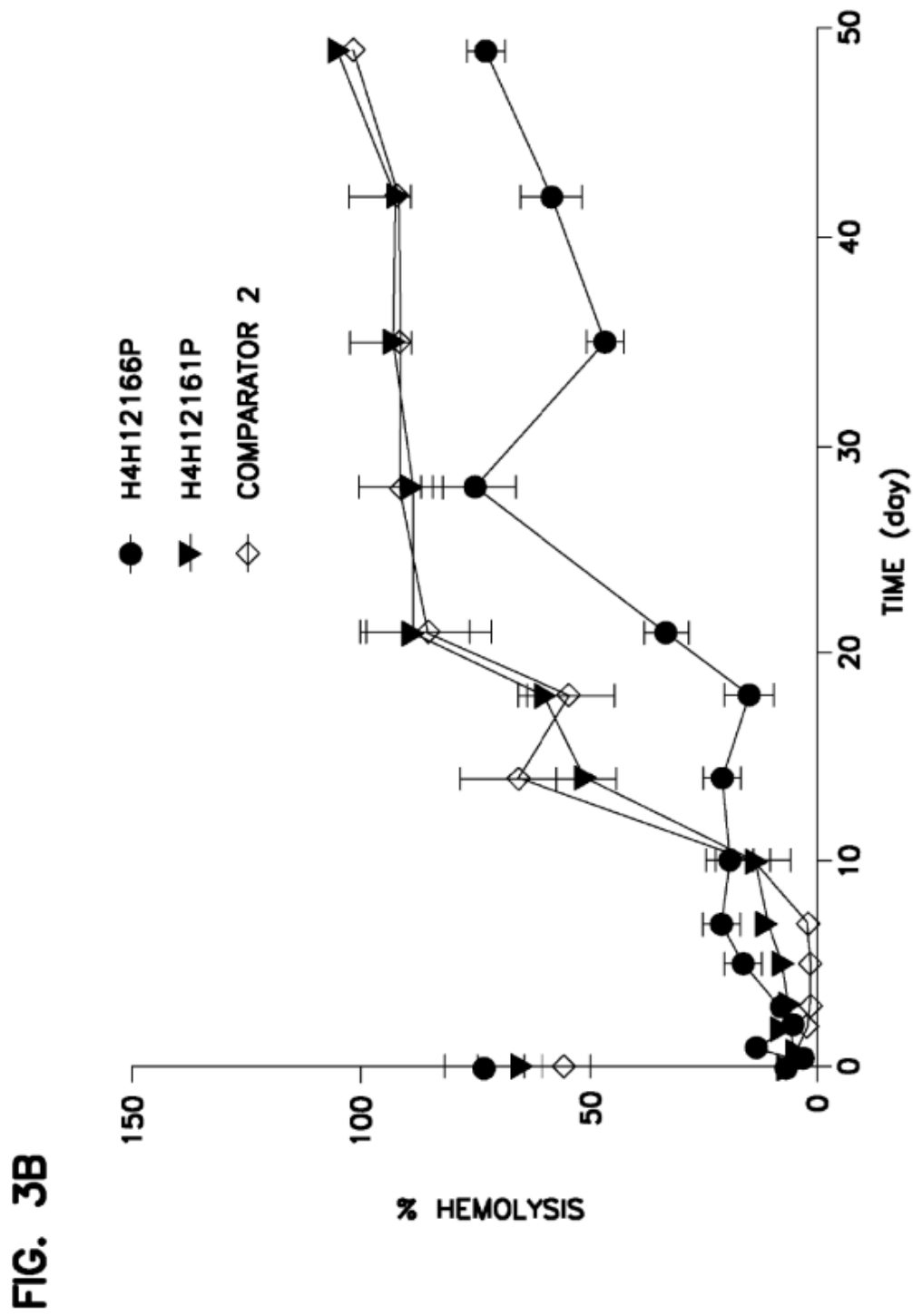


FIG. 3A





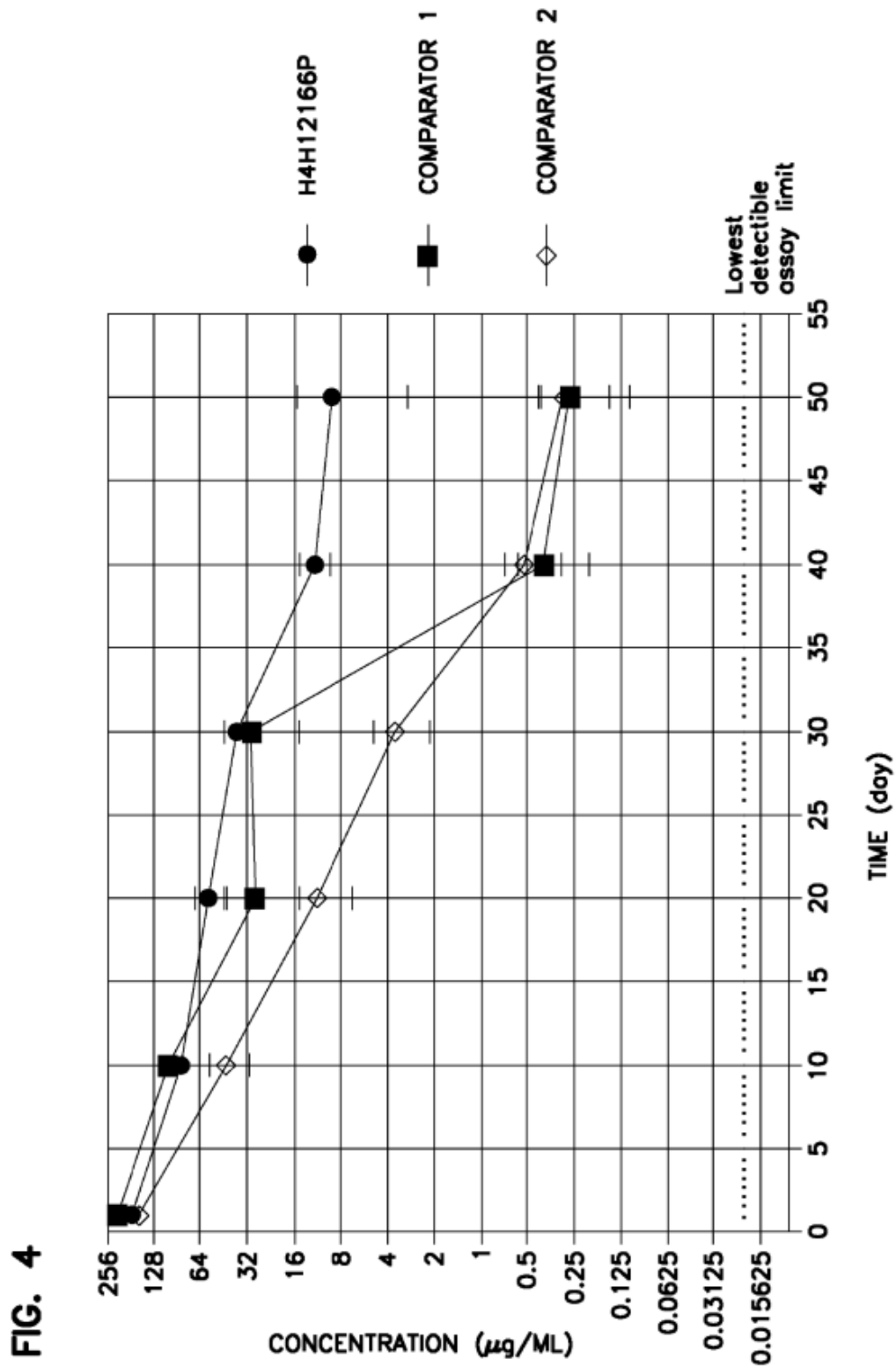


FIG. 5

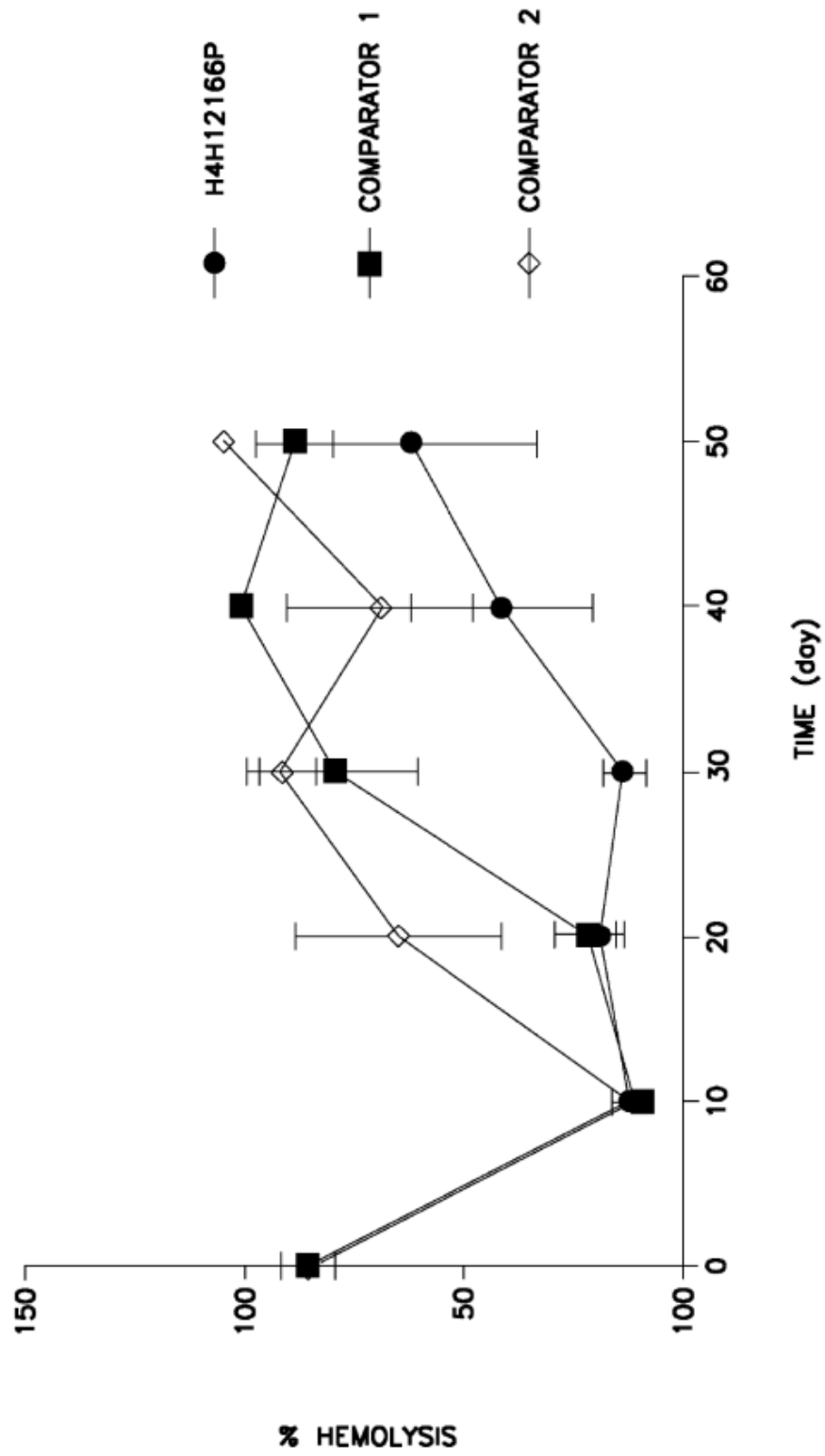
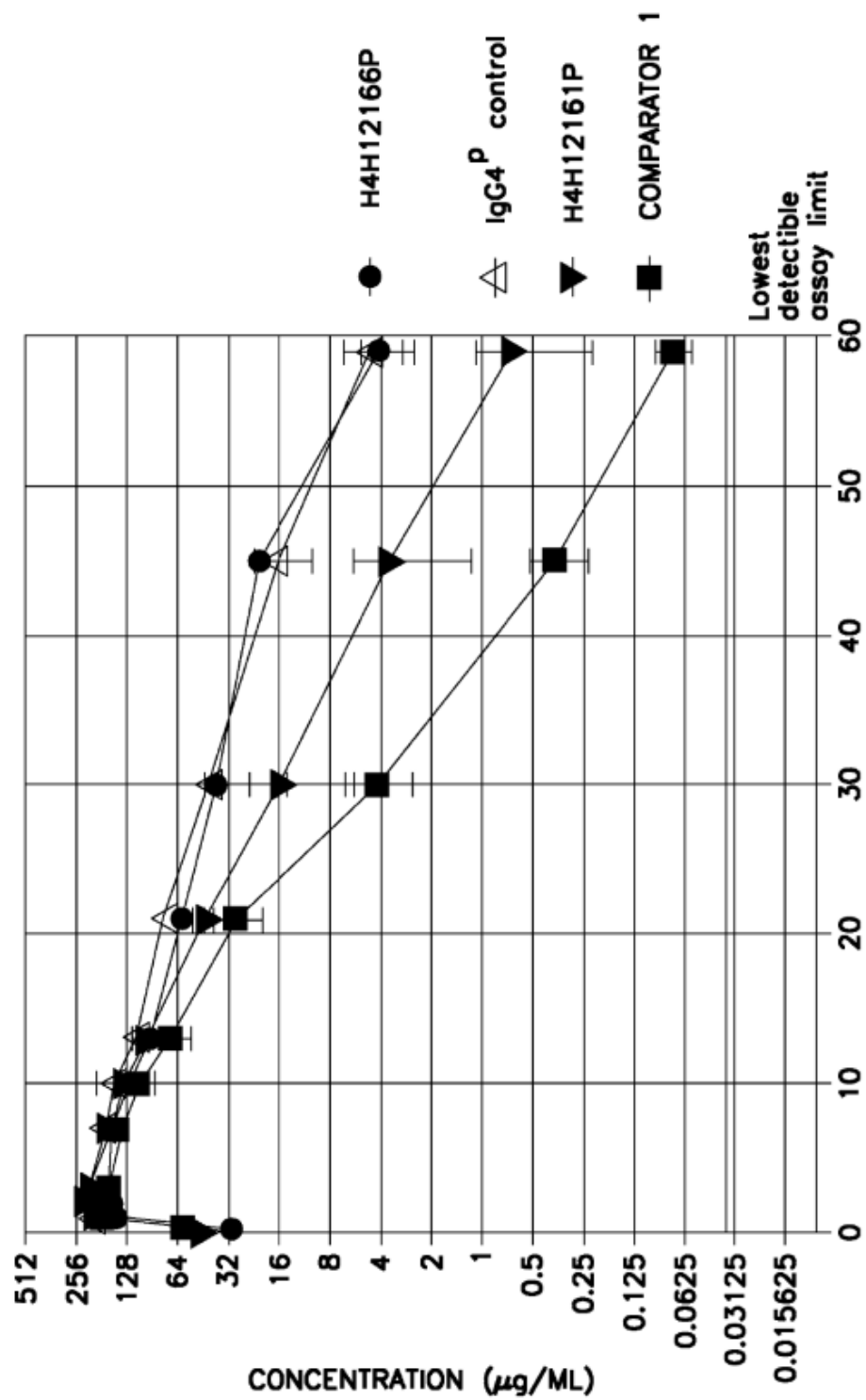


FIG. 6



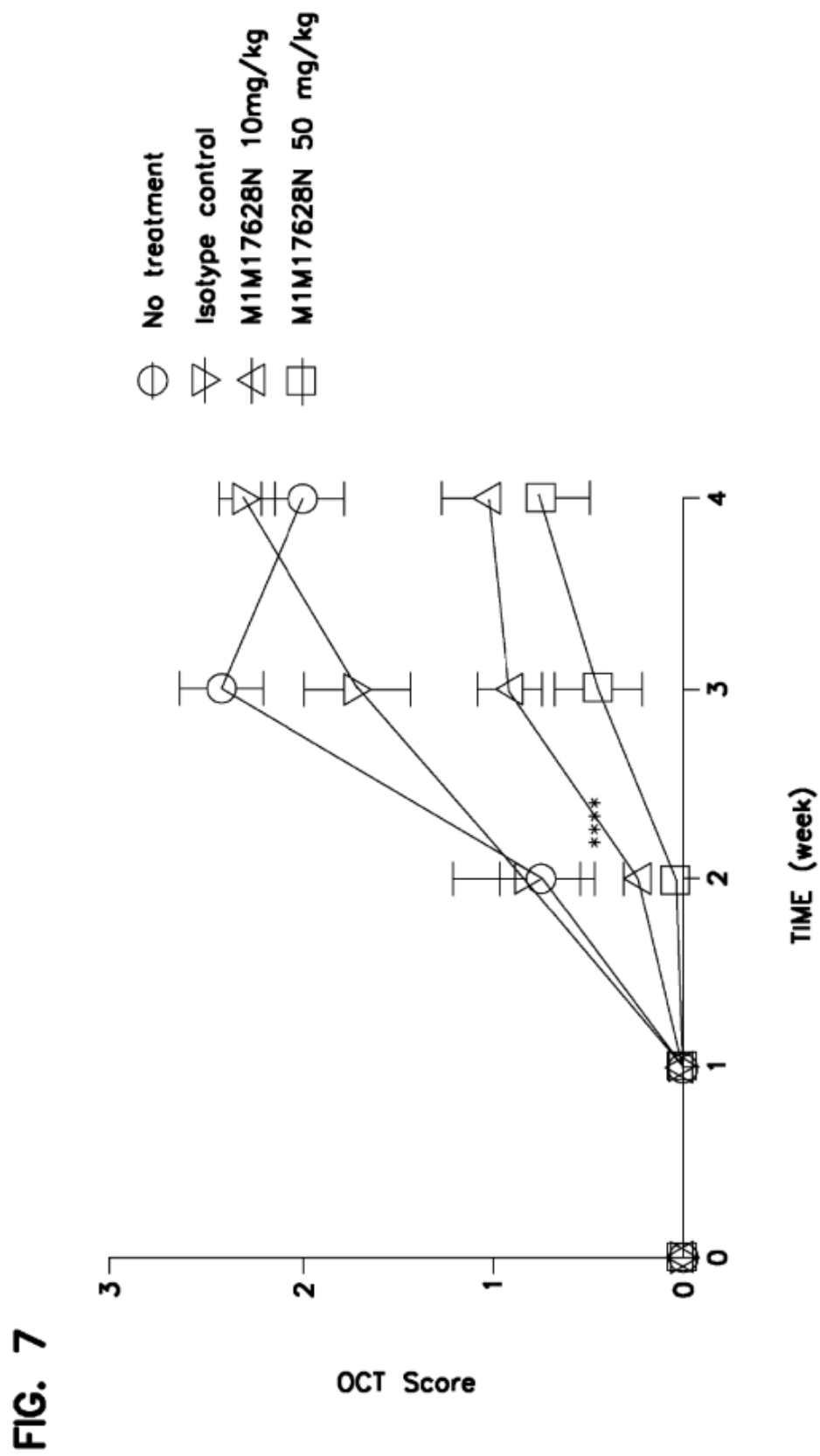


FIG. 8A

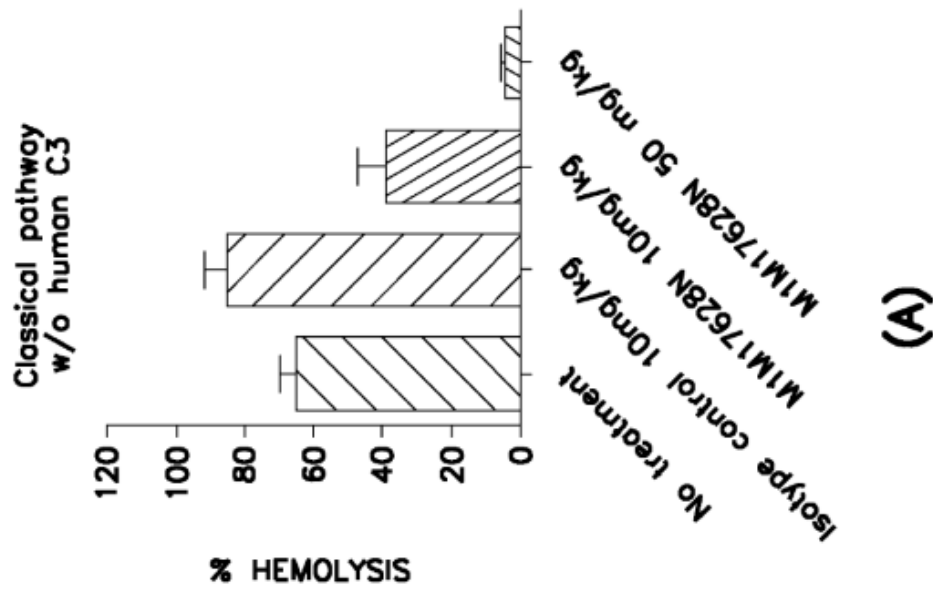


FIG. 8B

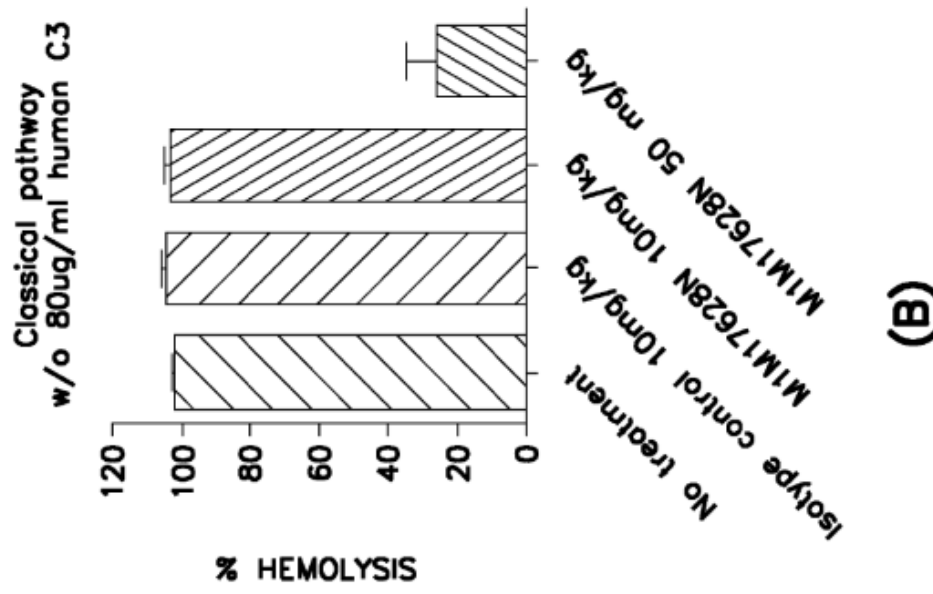


FIG. 9

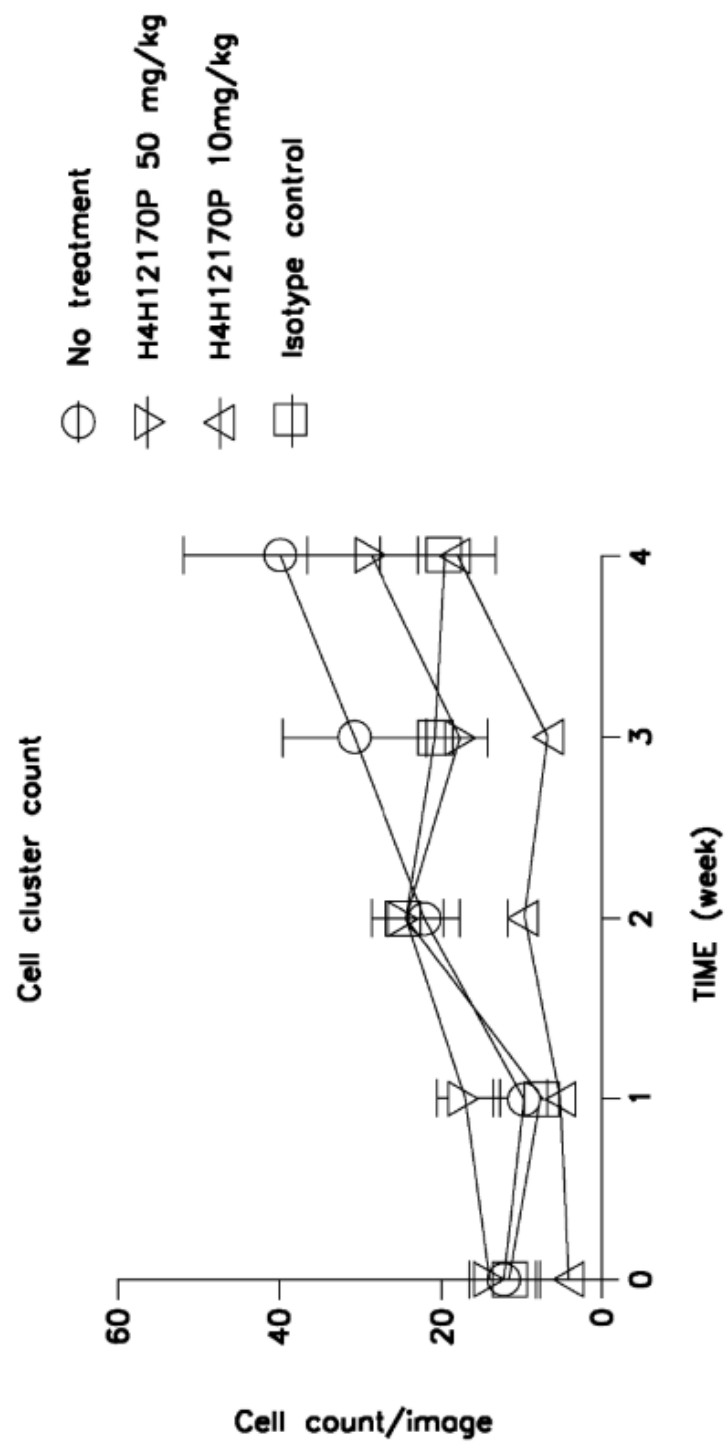
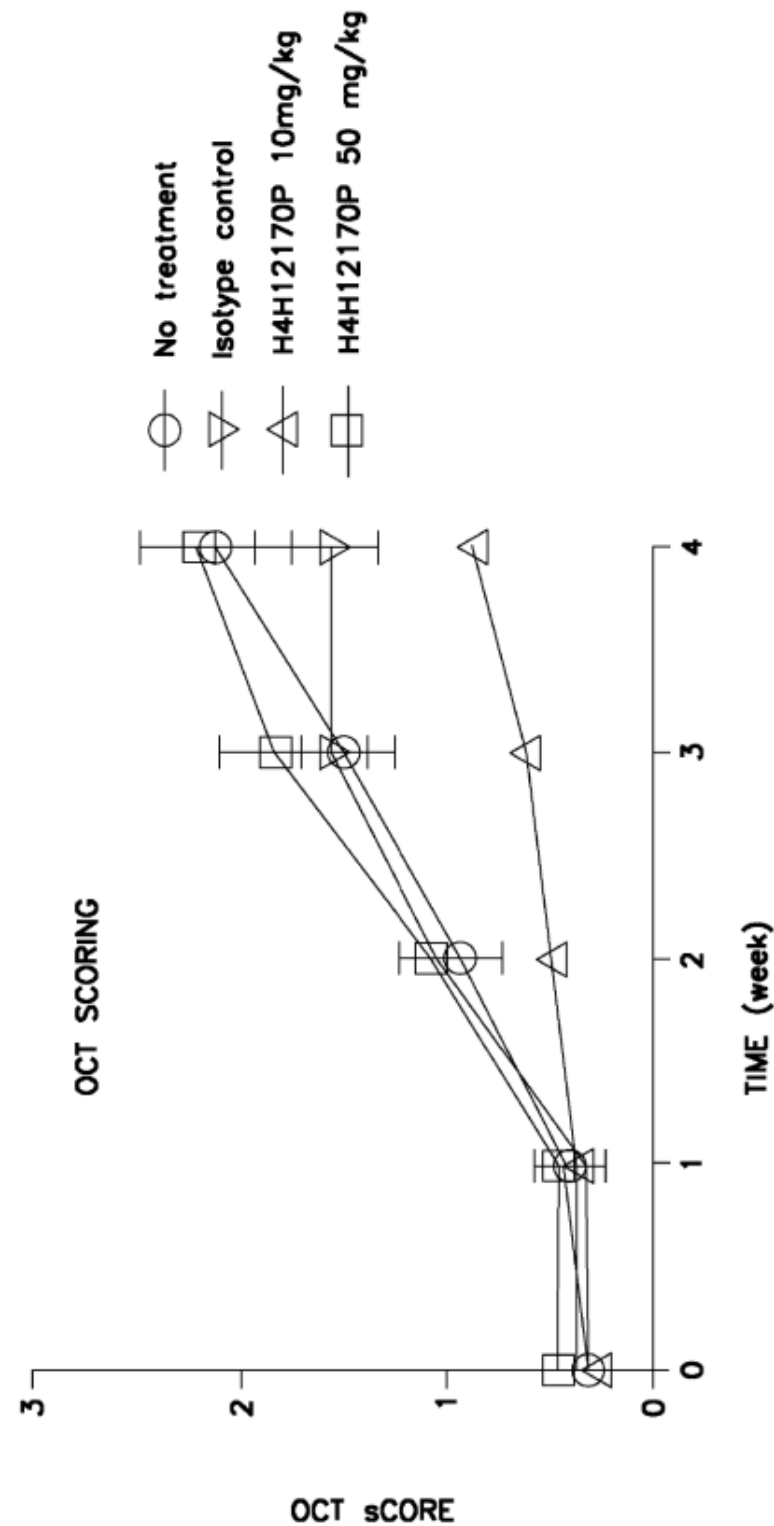


FIG. 10



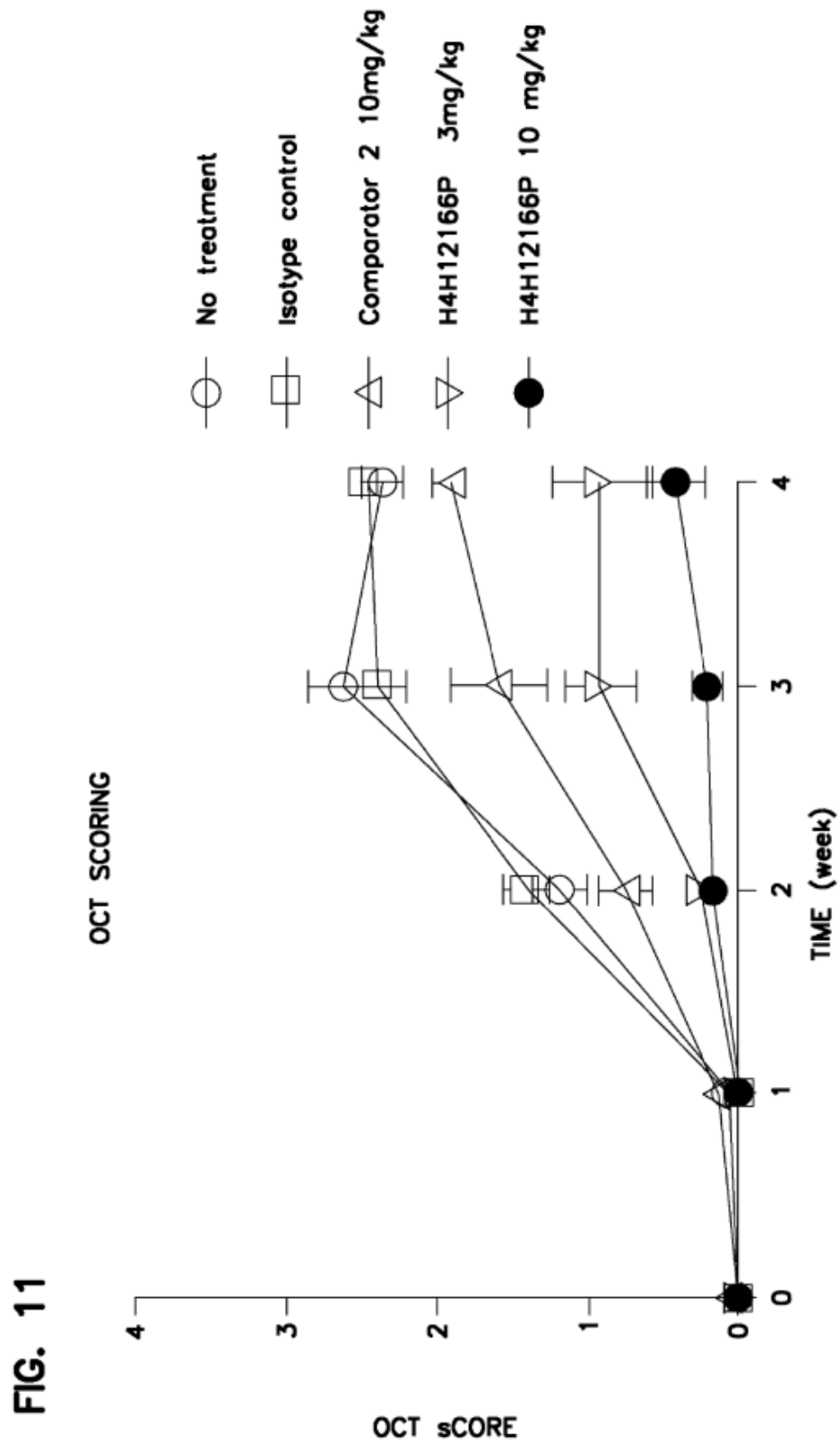


FIG. 12

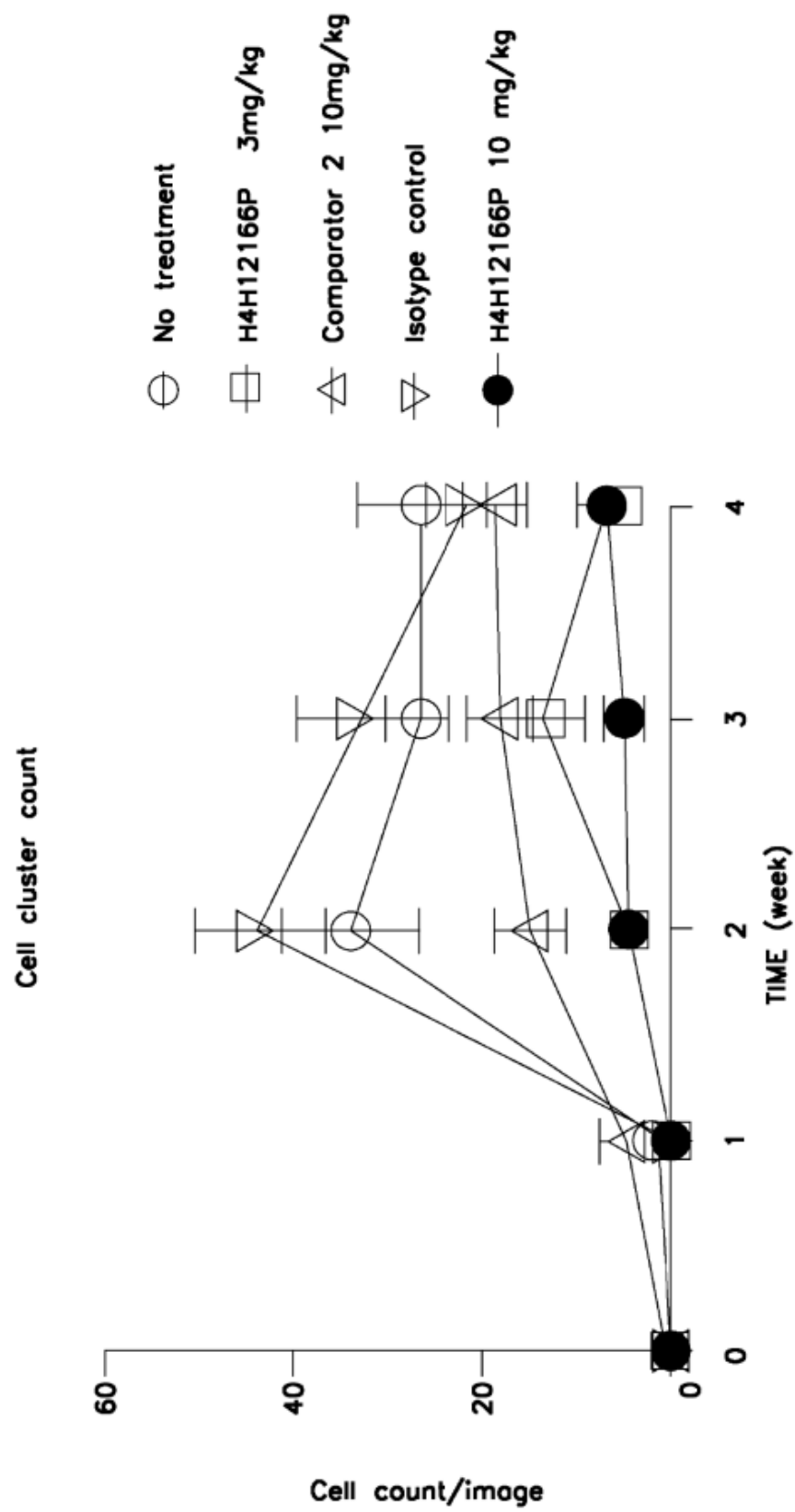


FIG. 13

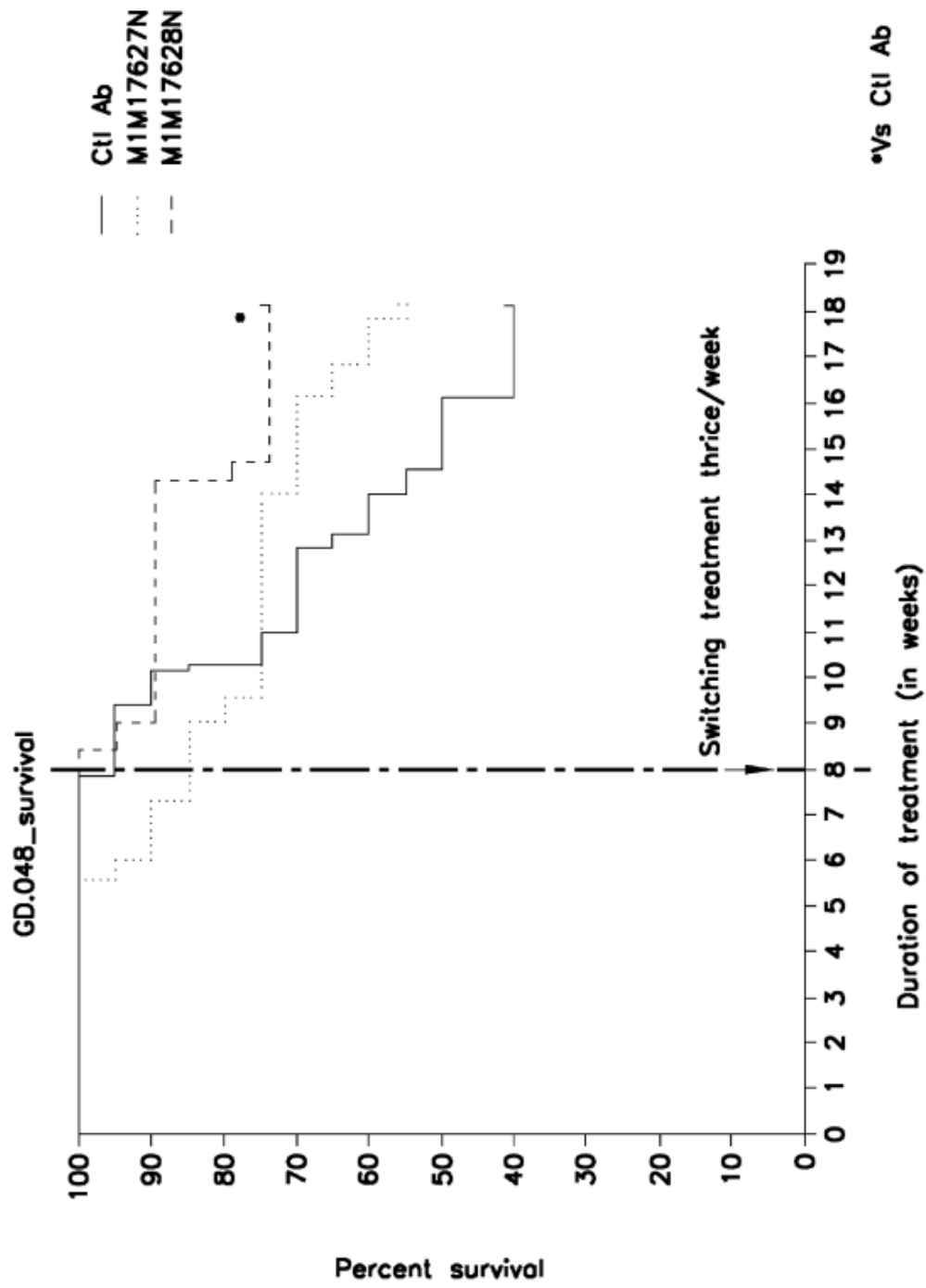
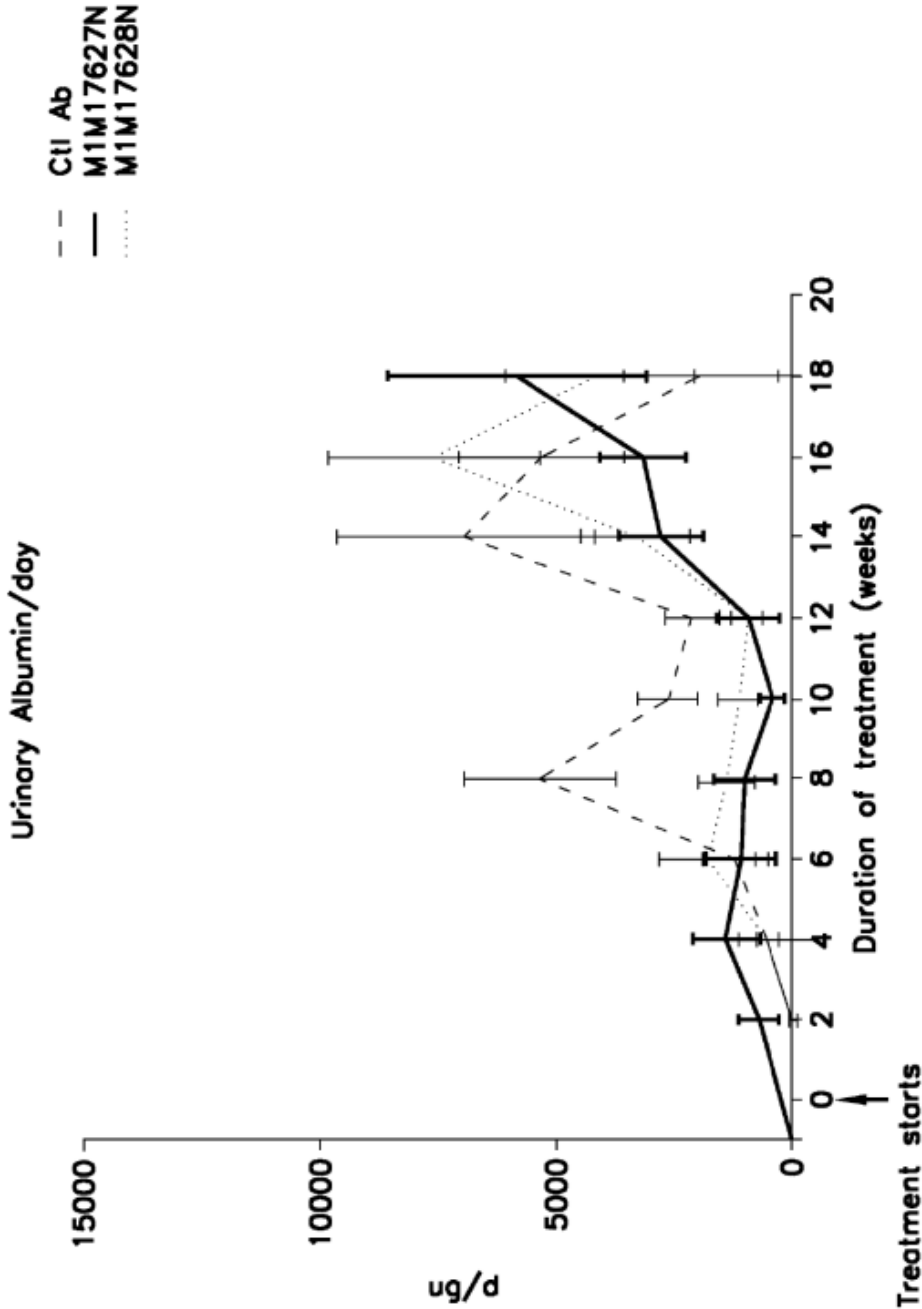
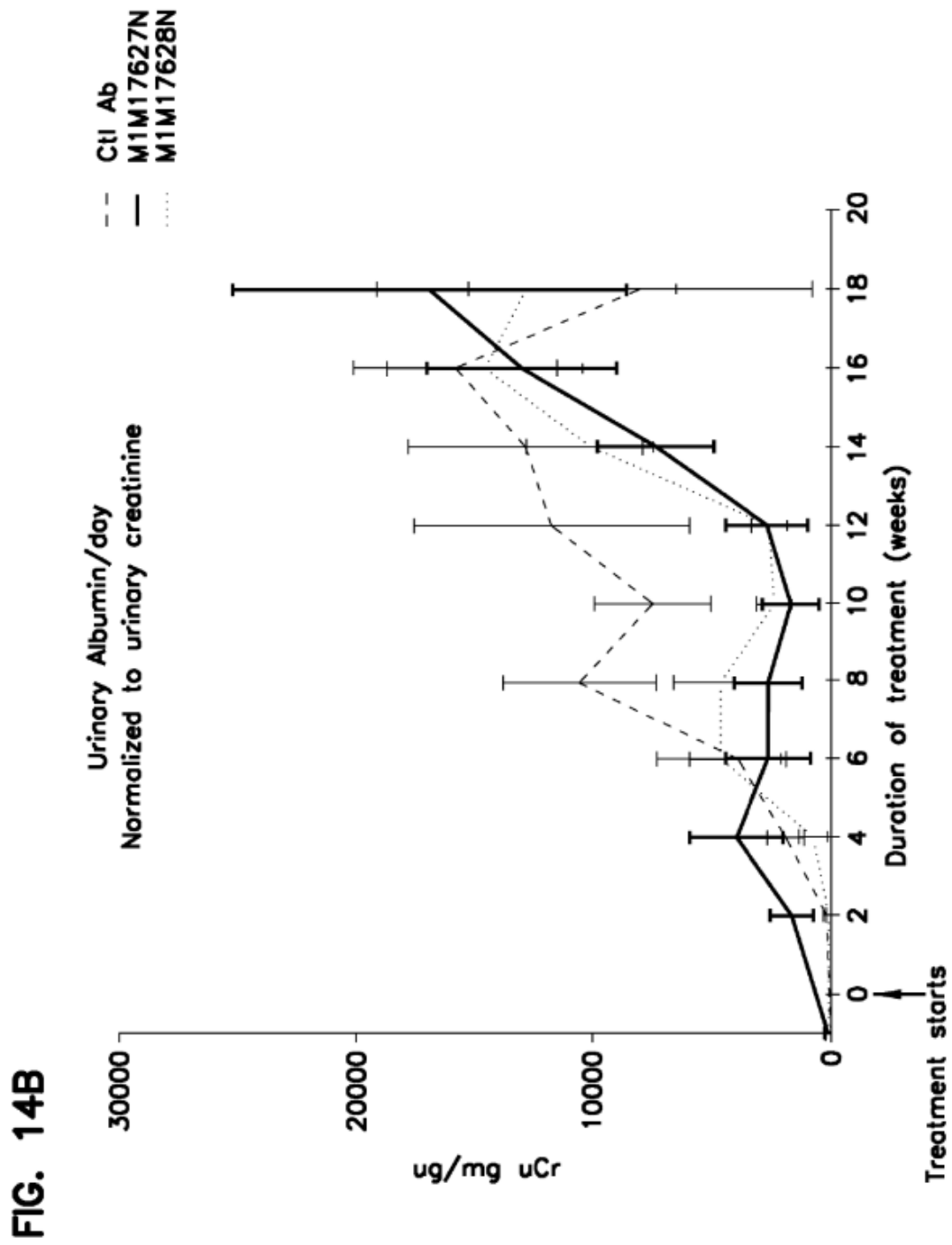


FIG. 14A





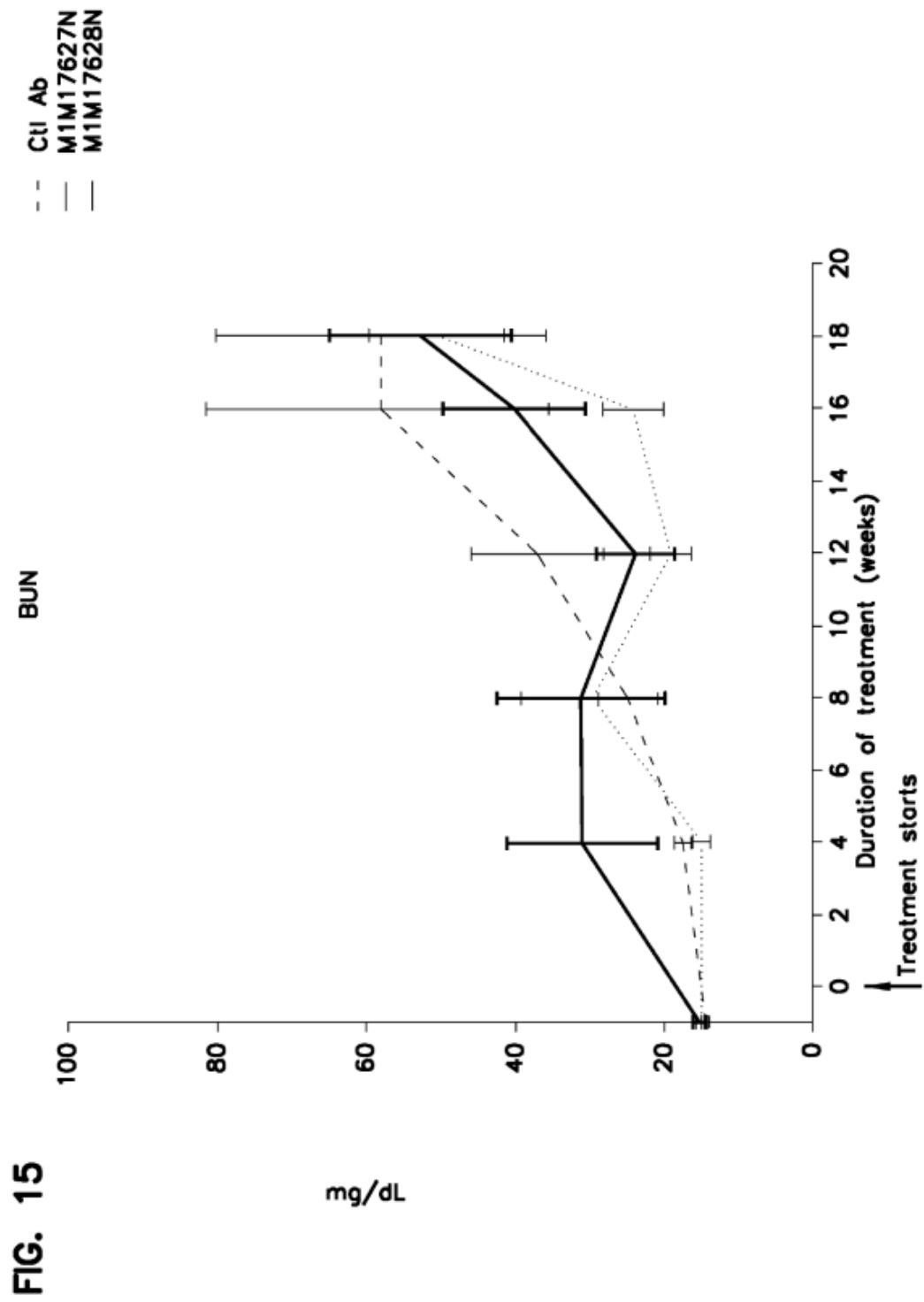


FIG. 16

