

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392243** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.10.09**

(51) Int. Cl. *C07K 16/18* (2006.01)  
*A61P 27/02* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2022.02.11**

---

(54) **НАЦЕЛЕННЫЕ НА КОМПЛЕМЕНТ С3 АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ**

---

(31) **PCT/EP2021/053526**

(32) **2021.02.12**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2022/053308**

(87) **WO 2022/171771 2022.08.18**

(71) Заявитель:

**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ  
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE);  
СИ-ДИ-АР-ЛАЙФ АГ (CH)**

(72) Изобретатель:

**Боррас Леонардо, Эшер Доминик,  
Юнгмихель Штефани, Ляйснер  
Кристиан, Рихле Филипп Роберт,  
Шайфеле Фабиан (CH)**

(74) Представитель:

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

---

(57) Обеспечиваются антигенсвязывающие белки со специфичностью к комплементу С3 и С3b. Также обеспечиваются способы лечения опосредованных комплементом С3 заболеваний и нарушений, способы ингибирования классического пути (КП), лектинового пути (ЛП) и/или альтернативного пути (АП) активации комплемента, и способы ингибирования активности локализованного в сосудистой оболочке комплемента С3.

---

**A1**

**202392243**

**202392243**

**A1**

## НАЦЕЛЕННЫЕ НА КОМПЛЕМЕНТ С3 АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ

5 **ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[001] Настоящее изобретение касается антигенсвязывающих белков, нацеленных на комплемент С3, и способов лечения опосредованных комплементом С3 заболеваний.

**УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

10 [002] Значительную проблему в лечении некоторых офтальмологических заболеваний и нарушений представляет доставка терапевтической молекулы в глубокие слои сетчатки. Доставке препятствуют многие факторы, включая множество физических границ в пределах глаза. К этим границам относятся роговичный и конъюнктивальный эпителий, гематоофтальмический барьер (ГОб) и гематоретинальный барьер (ГРБ),  
15 например, эндотелиальные клетки капилляров (внутренний ГРБ) и клетки пигментного эпителия сетчатки (клетки ПЭС, внешний ГРБ) (см., например, Jiang et al. Int J Ophthalmol. 2018; 11 (6): 1038 – 1044). Офтальмологическими заболеваниями, при которых особенно важна доставка в сетчатку, являются  
20 комплемент-опосредованные заболевания, такие как географическая атрофия (ГА).

[003] Географическая атрофия (ГА) является запущенной формой  
возрастной макулярной дегенерации (ВМД), характеризующейся потерей  
25 пигментного эпителия сетчатки и фоторецепторов в желтом пятне. Необратимая потеря остроты зрения наступает, когда ГА поражает центр фовеолярной зоны. Пациенты на более ранних стадиях ГА, как правило, испытывают дефицит зрительной функции даже до нарушения остроты зрения.

[004] Лежащая в основе патофизиология географической атрофии до  
конце не изучена; однако способствующим фактором считают дисрегуляцию  
30 активности комплемента. Несколько продуктов активации комплемента, включая С3а, С5а, С5b-9 и фактор комплемента Н (СФН), продемонстрировали повышенный уровень в образцах стекловидного тела, оболочке Бруха и других частях сосудистой оболочки пациентов с ГА по сравнению с контрольными образцами. Кроме того, по имеющейся информации, ингибиторы комплемента,

такие как CD59, мембраносвязанный ингибитор образования мембраноатакующего комплекса (МАК), и мембранный кофакторный белок (МКБ), регулятор мембраносвязанного комплемента, обладающий кофакторной активностью в отношении фактора комплемента I (CFI), на сниженном уровне присутствуют при ГА.

[005] В настоящее время не существует утвержденных способов лечения ГА. Изучалось множество исследовательских подходов, нацеленных на путь активации комплемента, но ни один из них до сих пор не был утвержден и не подтвердил свою эффективность. Отдельными примерами таких подходов являются экулизумаб / SOLIRIS (Alexion), LFG-316 (Novartis / MorphoSys), ARC-1905 (Ophthotech), POT-4 (AL-78898A; Alcon) и лампализумаб (FCFD45142).

[006] Недавние результаты клинического исследования APL-2 II фазы (клиническое исследование NCT02503332, “Изучение терапии APL-2 у пациентов с географической атрофией (FILLY)”) еще больше подтверждают роль пути активации комплемента в патогенезе ГА и демонстрируют положительный лечебный эффект в снижении прогрессирования ГА через ингибирование комплемента. Эти результаты также указывают на то, что централизованное ингибирование APL-2 каскада комплемента в C3 (в котором сходятся все пути активации комплемента; см. **Фигуру 1**) обладает потенциалом в более эффективном лечении ГА по сравнению с возможностями ингибиторов, ведущих к частичному ингибированию путей активации комплемента. Несмотря на это, снижение роста поражения при ГА, достигаемое благодаря APL-2, скромным. APL-2 имеет особенности, ограничивающие его эффективность. APL-2, пегилированное производное циклического тридекапептида компстатина (ингибитор компонента комплемента C3) обладает большой молекулярной массой, эквивалентной 350 кДа и гидродинамическим радиусом приблизительно 7,8 нм, что затрудняет глубокое проникновение в сетчатку. APL-2 имеет эффективность только в течение 1 месяца, возможно, из-за низкой концентрации 3,5 мМ. APL-2 также является пегилированной молекулой, что повышает ее вязкость и затрудняет введение путем инъекции в глаз. Соответственно, существует потребность в более эффективном снижении прогрессирования ГА.

[007] Одна из главных проблем в лечении ГА заключается в том, что наблюдаемая дисрегуляция активности комплемента происходит в глубоких слоях сетчатки. Авторы изобретения предполагают, что улучшение

проникновения в связанные с заболеванием ткани сетчатки (т. е., пигментный эпителий сетчатки (ПЭС), оболочку Бруха и другие части сосудистой оболочки) необходимо для достижения большего снижения роста поражения при ГА. В этом отношении небольшой фрагмент антитела обеспечивает несколько преимуществ по сравнению с другими биопрепаратами и антителами. Малые форматы антител обеспечивают возможность: 1) улучшенного внутриглазного проникновения в соответствующие ткани сетчатки; и 2) доставку большего количества лекарственного продукта на мг или мл путем интравитреальной инъекции.

## 10 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[008] Настоящее изобретение обеспечивает антигенсвязывающие белки со специфичностью к комплементу C3.

[009] В одном аспекте изобретение обеспечивает антигенсвязывающий белок или его фрагмент, который связывает эпитоп на комплементе C3, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен ингибировать пути активации комплемента, включая классический путь (КП), лектиновый путь (ЛП) и альтернативный путь (АП).

[010] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен связывать комплемент C3 и C3b.

20 [011] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен связывать эпитоп на комплементе C3, причем такое связывание предотвращает образование C3-конвертазы.

[012] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен конкурировать с одним или несколькими антигенсвязывающими белками, включая M0122, M0123, M0124, M0228 и M0251.

[013] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент включает одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, Fv-фрагмент, диатело, малый миметик антитела или однодоменное антитело, такое как, например, sdAb, sdFv, нанотело, V-Nag или VHH. В предпочтительных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент включает scFv или VHH.

30 [014] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент включает CDR-H3, имеющий по меньшей мере 80 %

подобия с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 21.

[015] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент включает CDR-H3, имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 21.

[016] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент включает переменную тяжелую цепь (VH) и переменную легкую цепь (VL), причем VH включает последовательность CDR-H1, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 1, 4, 7, 13 и 19, последовательность CDR-H2, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 2, 5, 8, 14 и 20, последовательность CDR-H3, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 3, 6, 9, 15 и 21; причем VL включает последовательность CDR-L1, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 10, 16 и 22, последовательность CDR-L2, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 11, 17 и 23, и последовательность CDR-L3, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 12, 18 и 24.

[017] В некоторых вариантах осуществления VH имеет по меньшей мере 80 % подобия с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 29 и 31, и/или VL имеет по меньшей мере 80 % подобия с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 30 и 32.

[018] В некоторых вариантах осуществления VH имеет по меньшей мере 80 % идентичности с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 29 и 31, и/или VL имеет по меньшей мере 80 % подобия с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 30 и 32.

[019] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент включает VH и VL, причем VH включает последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 7, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 8 и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 9; причем VL включает последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 10, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 11 и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 12.

[020] В некоторых вариантах осуществления VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и VL включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

[021] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент включает VH и VL, причем VH включает последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 13, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 14 и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 15; причем VL включает последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 16, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 17 и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 18.

[022] В некоторых вариантах осуществления VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и VL включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

[023] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент включает VH и VL, причем VH включает последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 19, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 20 и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 21; причем VL включает последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 22, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 23 и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 24.

[024] В некоторых вариантах осуществления VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и VL включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.

[025] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент включает домен VHH, причем домен VHH включает последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3.

[026] В некоторых вариантах осуществления домен VHH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

[027] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент включает домен VHH, причем домен VHH включает последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 5 и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 6.

[028] В некоторых вариантах осуществления домен VHH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

[029] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет связывающую аффинность к C3 и C3b по меньшей мере приблизительно  $10^{-8}$  M. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет связывающую аффинность к

С3 и С3b от приблизительно  $10^{-9}$  М до приблизительно  $10^{-14}$  М. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет связывающую аффинность к С3 и С3b от приблизительно  $10^{-10}$  М до приблизительно  $10^{-12}$  М. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет приблизительно эквивалентную связывающую аффинность к С3 и С3b. В некоторых вариантах осуществления связывающая аффинность к С3 находится в пределах одного порядка по отношению к связывающей аффинности к С3b.

[030] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет связывающую аффинность к С3a, iС3b, С4, С4b, С5 и/или С5b приблизительно  $10^{-4}$  М или слабее. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет более слабую связывающую аффинность к С3a, iС3b, С4, С4b, С5 и/или С5b по сравнению со связывающей аффинностью к С3 и С3b. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент не имеет связывающей аффинности к С3a, iС3b, С4, С4b, С5 и/или С5b.

[031] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен ингибировать активность путей активации комплемента КП, ЛП и АП по меньшей мере приблизительно на 80 %, по меньшей мере приблизительно на 85 %, по меньшей мере приблизительно на 90 % или по меньшей мере приблизительно на 95 %.

[032] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен в эквивалентной или приблизительно эквивалентной степени ингибировать активность путей активации комплемента КП, ЛП и АП. В некоторых вариантах осуществления ингибирование активности путей активации комплемента КП, ЛП и АП составляет по меньшей мере приблизительно 80 %, по меньшей мере приблизительно 85 %, по меньшей мере приблизительно 90 % или по меньшей мере приблизительно 95 %.

[033] В некоторых вариантах осуществления активность путей активации комплемента КП, ЛП и АП определяют путем измерения уровня гемолиза эритроцитов в присутствии антигенсвязывающего белка или его фрагмента по сравнению с уровнем гемолиза эритроцитов в отсутствие антигенсвязывающего белка или его фрагмента.

[034] В некоторых вариантах осуществления активность путей активации комплемента КП, ЛП и АП определяют путем измерения образования мембраноатакующего комплекса (МАК) в присутствии антигенсвязывающего белка или его фрагмента по сравнению с образованием МАК в отсутствие антигенсвязывающего белка или его фрагмента.

[035] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен ингибировать активность С3-конвертазы по меньшей мере приблизительно на 80 %, по меньшей мере приблизительно на 85 %, по меньшей мере приблизительно на 90 % или по меньшей мере приблизительно на 95 %.

[036] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен ингибировать петлю амплификации С3-конвертазы.

[037] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен проникать через оболочку Бруха.

[038] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен ингибировать активность С3 сосудистой оболочки.

[039] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет молекулярную массу приблизительно 60 кДа или меньше. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет молекулярную массу от приблизительно 20 кДа до приблизительно 30 кДа. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет молекулярную массу от приблизительно 10 кДа до приблизительно 20 кДа. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет молекулярную массу приблизительно 25 кДа. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет молекулярную массу приблизительно 15 кДа.

[040] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет перекрестную реактивность с С3 яванского макака.

[041] В одном аспекте изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, включающую вышеописанный антигенсвязывающий белок или его

фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель. Таким образом, один аспект касается применения связывающего белка в соответствии с изобретением в приготовлении фармацевтической композиции для лечения опосредованного комплементом С3 заболевания или нарушения у субъекта.

5 [042] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет низкую вязкость.

[043] В некоторых вариантах осуществления вязкость составляет от приблизительно 1 сП до приблизительно 50 сП. В некоторых вариантах осуществления вязкость является меньшей или равняется приблизительно 20 сП.

10 [044] В одном аспекте изобретение обеспечивает выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антигенсвязывающий белок или его фрагмент, как описано выше.

[045] В другом аспекте изобретение обеспечивает вектор экспрессии, включающий вышеописанную молекулу нуклеиновой кислоты.

15 [046] В еще одном аспекте изобретение обеспечивает клетку-хозяин, включающую вышеописанный вектор экспрессии.

[047] В еще одном аспекте обеспечивается способ производства антигенсвязывающего белка или его фрагмента, как описано выше, включающий

20 I) культивирование клетки-хозяина, как описано выше, в условиях, обеспечивающих возможность экспрессии описанного авторами белка; и

II) извлечение белка; и, необязательно

III) дальнейшую очистку и/или модифицирование и/или рецептирование белка.

25 [048] В одном аспекте изобретение обеспечивает способ лечения опосредованного комплементом С3 заболевания или нарушения у субъекта, включающий введение субъекту, который в этом нуждается, антигенсвязывающего белка или его фрагмента, как описано выше. Таким образом, изобретение также обеспечивает антигенсвязывающий белок или его фрагмент, как описано выше, для применения согласно способу лечения  
30 опосредованного комплементом С3 заболевания или нарушения. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент вводят путем местного, субконъюнктивного, интравитреального, ретробульбарного и/или интракамерального введения.

[049] В некоторых вариантах осуществления опосредованное комплементом С3 заболевание или нарушение выбрано из группы, к которой относятся возрастная макулярная дегенерация, географическая атрофия, неоваскулярная глаукома, диабетическая ретинопатия, синдром Терри, ретролентальная фиброплазия, аутоиммунный увеит, хориоретинит, ретинит, ревматоидный артрит, псориаз и атеросклероз.

[050] В одном аспекте изобретение обеспечивает способ ингибирования классического пути (КП), лектинового пути (ЛП) и альтернативного пути (АП) активации комплемента, причем способ включает приведение комплемента С3 в контакт с антигенсвязывающим белком или его фрагментом, который связывает эпитоп на комплементе С3. Таким образом изобретение обеспечивает антигенсвязывающий белок или его фрагмент, как описано авторами, для применения согласно способу лечения опосредованного комплементом С3 заболевания или нарушения путем ингибирования классического пути (КП), лектинового пути (ЛП) и альтернативного пути (АП) активации комплемента. Изобретение также обеспечивает антигенсвязывающий белок или его фрагмент, как описано выше, для применения согласно способу лечения опосредованного комплементом С3 заболевания или нарушения путем ингибирования активности локализованного в сосудистой оболочке комплемента С3.

[051] В одном аспекте изобретение обеспечивает способ ингибирования активности локализованного в сосудистой оболочке комплемента С3, причем способ включает внутриглазное введение антигенсвязывающего белка или его фрагмента, который связывает эпитоп на комплементе С3.

[052] В некоторых вариантах осуществления описанных авторами способов антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен связывать комплемент С3 и С3b.

[053] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен связывать эпитоп на комплементе С3, причем такое связывание предотвращает образование С3-конвертазы.

[054] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен конкурировать с одним или несколькими антигенсвязывающими белками, включая M0122, M0123, M0124, M0228 и M0251.

[055] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент включает одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), Fab-фрагмент или VHH.

5 [056] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент включает CDR-H3, имеющий по меньшей мере 80 % подобия с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 21.

10 [057] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент включает CDR-H3, имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 21.

15 [058] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент включает переменную тяжелую цепь (VH) и переменную легкую цепь (VL), причем VH включает последовательность CDR-H1, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 1, 4, 7, 13 и 19, последовательность CDR-H2, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 2, 5, 8, 14 и 20, последовательность CDR-H3, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 3, 6, 9, 15 и 21; причем VL включает последовательность CDR-L1, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 10, 16 и 22, последовательность CDR-L2, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 11, 17 и 23, и последовательность CDR-L3, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 12, 18 и 24.

20 [059] В некоторых вариантах осуществления VH имеет по меньшей мере 80 % подобия с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 29 и 31, и/или VL имеет по меньшей мере 80 % подобия с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 30 и 32.

30 [060] В некоторых вариантах осуществления VH имеет по меньшей мере 80 % идентичности с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 29 и 31, и/или VL имеет по меньшей мере 80 % идентичности с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 30 и 32.

[061] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен проникать через оболочку Бруха.

[062] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен ингибировать активность С3 сосудистой оболочки.

[063] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет молекулярную массу приблизительно 60 кДа или меньше, например, приблизительно 50 кДа или меньше, приблизительно 40 кДа или меньше, приблизительно 35 кДа или меньше, приблизительно 30 кДа или меньше, приблизительно 25 кДа или меньше, приблизительно 20 кДа или меньше, приблизительно 15 кДа или меньше. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет молекулярную массу от приблизительно 20 кДа до приблизительно 30 кДа. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет молекулярную массу от приблизительно 10 кДа до приблизительно 20 кДа. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет молекулярную массу приблизительно 25 кДа. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет молекулярную массу приблизительно 15 кДа.

[064] В одном аспекте изобретение обеспечивает способ обнаружения С3 и С3b в биологическом образце, включая

(а) приведение образца в контакт с по меньшей мере одним антигенсвязывающим белком или его фрагментом, как описано выше;

(б) обеспечение возможности образования комплексов между одним или обоими из С3 и С3b и антигенсвязывающим белком или его фрагментом в образце; и

(в) обнаружение вышеупомянутого антигенсвязывающего белка или его фрагмента. В предпочтительных вариантах осуществления, антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен связывать комплемент С3 и С3b.

[065] В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент обнаруживаются через обнаружимый сигнал.

[066] В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент обнаруживаются при помощи ELISA, иммуноцитохимии (ИЦХ), иммуногистохимии (ИГХ), вестерн-блоттинга и/или проточной цитометрии.

[067] В возможных вариантах биологический образец представляет собой образец ткани, например, ткани сетчатки человека, такой как зафиксированный образец ткани. В возможных вариантах зафиксированный образец ткани представляет собой зафиксированный в формалине и залитый парафином образец ткани.

[068] В одном аспекте обеспечивается комплект для обнаружения С3, включающий антигенсвязывающий белок или его фрагмент, как описано выше, и инструкции по применению.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР**

[069] Упомянутые выше и другие особенности и преимущества настоящего изобретения станут более понятны из представленного далее подробного описания пояснительных вариантов осуществления с прилагаемыми к ним фигурами. Копии публикации патента или патентной заявки с цветной(ыми) фигурой(ами) предоставляются Ведомством по запросу и по уплате необходимого сбора.

[070] *Фигура 1* показывает три пути активации комплемента: классический (КП), лектиновый (ЛП) и альтернативный (АП) пути, которые сходятся в С3.

[071] *Фигура 2* показывает процесс создания библиотеки антител против С3.

[072] *Фигура 3А – Фигура 3В* показывают анализ ELISA, подтверждающий отличный иммунный ответ против С3 у кролика и ламы. *Фигура 3А* показывает анализ ELISA с испытанием белка С3, выделенного из плазмы человека. *Фигура 3В* показывает анализ ELISA с испытанием присутствия антител против С3 в сыворотке кролика (вверху) и ламы (внизу), которым путем инъекции вводили выделенный человеческий С3, показанный на *Фигуре 3А*.

[073] *Фигура 4А* представляет сводную таблицу библиотек антител против С3, а *Фигура 4В* показывает разнообразие CDR-H3 по длине в аминокислотах.

[074] *Фигура 5* показывает процесс отбора на антитела против С3.

[075] *Фигура 6* показывает отбор кандидатных антител, нацеленных на С3, на их способность к ингибированию всех трех путей активации комплемента

в человеческой сыворотке. Каждое антитело использовали в концентрации 2 мкМ.

[076] **Фигура 7А – Фигура 7D** демонстрируют, что четыре антитела против С3, ингибирующие все три путь активации комплемента, распознают три  
5 разных эпитопа на С3. Фигура 7А представляет конкурентный анализ, который демонстрирует отсутствие конкуренции между M0122 с каждым из трех остальных антител против С3. Фигура 7В представляет конкурентный анализ, который демонстрирует отсутствие конкуренции между M0124 с каждым из трех остальных антител против С3. Фигура 7С представляет конкурентный анализ,  
10 который демонстрирует наличие конкуренции между M0228 и M0251, но не M0124 и M0122. Фигура 7D представляет конкурентный анализ, который демонстрирует наличие конкуренции между M0123 и M0251, а также M0123 и M0228, но не M0124 и M0122.

[077] **Фигура 8А – Фигура 8В** показывают, что M0122, M0124 и M0228  
15 непосредственно связываются с С3 и С3b. Фигура 8А показывает анализ ELISA, который демонстрирует M0122, M0124 и M0228 связываются с С3 непосредственно. Фигура 8В показывает анализ ELISA, который демонстрирует M0122, M0124 и M0228 связываются с С3b непосредственно.

[078] **Фигура 9А – Фигура 9В** показывают, что M0122, M0124 и M0228  
20 эффективно ингибируют классический и альтернативный пути. Фигура 9А показывает, что M0122, M0124 и M0228 эффективно ингибируют классический путь. Фигура 9В показывает, что M0122, M0124 и M0228 эффективно ингибируют альтернативные пути.

[079] **Фигура 10** показывает параметры аффинности M0122, M0124 и  
25 M0228.

[080] **Фигура 11** показывает схему анатомической структуры сетчатки и  
сосудистой оболочки, включая оболочку Бруха. Антитела против С3 scFv согласно изобретению показаны как способные преодолевать оболочку Бруха и проникать глубже в сосудистую оболочку, тогда как взятое для сравнения  
30 связывающееся с С3 терапевтическое средство, APL-2, не способно проникать через оболочку Бруха. Тот же принцип касается и других форматов антигенсвязывающего белка согласно изобретению.

[081] **Фигура 12** показывает отрицательную связь между гидродинамическими радиусами и проницаемостью, с показом комплемент-

связывающих терапевтических средств в сравнении с scFv согласно изобретению.

[082] *Фигура 13А и Фигура 14В* показывают сравнение scFv и суррогата APL-2 в проникновении через оболочку Бруха. На *Фигуре 14А* показано окрашивание йодидом бария (ПЭГ), на *Фигуре 13В* показано окрашивание Кумасси (белок). Суррогат APL2 включает один компонент APL-1 на 40 кДа линейном ПЭГ. КО – камера для образцов, ДК – диффузатная камера, КН - контроль нагрузки (начальная концентрация в КО).

[083] *Фигура 14А – Фигура 14С* показывают, что M0122, M0124 и M0251 эффективно ингибируют классический, альтернативный и лектиновый пути в сыворотке яванского макака. *Фигура 14А* показывает, что M0122, M0124 и M0251 эффективно ингибируют все три пути. Каждое антитело использовали в концентрации 2 мкМ. *Фигура 14В* показывает, что M0122, M0124 и M0251 эффективно ингибируют классический путь. *Фигура 14С* показывает, что M0122, M0124 и M0251 эффективно ингибируют альтернативные пути.

[084] *Фигура 15А – Фигура 15В* показывают, что M0122, M0124 и M0251 связываются с C3 яванского макака. *Фигура 15А* показывает M0122, M0124. *Фигура 15В* показывает M0251.

[085] *Фигура 16* показывает, что M0122, M0123 и M0124 эффективно ингибируют лектиновый путь.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[086] Обеспечиваются антигенсвязывающие белки, обладающие специфичностью связывания к комплементу C3 и продукту расщепления комплемента C3 – C3b. Также обеспечиваются способы лечения или профилактики опосредованных комплементом C3 заболеваний и нарушений.

[087] В некоторых аспектах описанные авторами антигенсвязывающие белки способны ингибировать классический путь (КП), лектиновый путь (ЛП) и альтернативный путь (АП) активации комплемента. Описанные авторами антигенсвязывающие белки способны ингибировать все три пути одновременно. Описанные авторами антигенсвязывающие белки способны ингибировать все три пути в сосудистой оболочке глаза.

[088] В целом номенклатура, применяемая в контексте описываемых авторами культур клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики и химии и гибридизации белков и нуклеиновых кислот

является общеизвестной и общеупотребимой среди специалистов в данной области техники. Обеспечиваемые авторами способы и технологии, как правило, выполняются в соответствии с традиционными способами, которые общеизвестны среди специалистов в данной области техники и описаны в  
5 разных общих и более специализированных источниках, приводимых и обсуждаемых в тексте данного описания, если не указано иное. Ферментативные реакции и технологии очистки выполняют в соответствии с техническими требованиями производителя, согласно общепринятой в данной области техники практике или как описано авторами данного изобретения. Номенклатура и  
10 описываемые авторами лабораторные процедуры и технологии, применяемые в контексте аналитической химии, синтетической органической химии и лекарственной и фармацевтической химии являются общеизвестными и общеупотребимыми среди специалистов в данной области техники. Стандартные технологии применяют для химического синтеза, химических анализов,  
15 приготовления и рецептирования фармацевтических препаратов, их доставки и лечения пациентов.

[089] Если нет иного определения, применяемые авторами научные и технические термины имеют значения, традиционно понимаемые специалистами в данной области техники. В случае возможной неопределенности  
20 представленные авторами определения имеют приоритет перед любым словарным или взятым из внешнего источника определением. Если контекстом не требуется иное, термины в единственном числе включают и форму множественного числа, так же, как термины во множественном числе включают единственное число. Применение “или” означает “и/или”, если специально не  
25 указано иное. Применение термина “включая”, а также других его форм, таких как “включает” и “включенный”, не является ограничивающим.

[090] Для облегчения понимания изобретения следует в первую очередь дать определение некоторым терминам.

#### Антигенсвязывающие белки

[091] Применяемый в контексте данного описания термин “антитело”  
30 или “антигенсвязывающий белок” касается молекулы иммуноглобулина, которая специфически связывается или иммунологически реагирует с антигеном или эпитопом, и охватывает как поликлональные, так и моноклональные антитела, а также функциональные фрагменты антител, включая, помимо прочих,

антигенсвязывающие фрагменты (Fab), F(ab')<sub>2</sub> фрагменты, Fab' фрагменты, Fv-фрагменты, фрагменты рекомбинантного IgG (rIgG), одноцепочечные переменные фрагменты (scFv) и фрагменты однодоменных антител (например, sdAb, sdFv, нанотело, VHH). Термин “антитело” включает подвергнутые генной инженерии или иным образом модифицированные формы иммуноглобулинов, такие как внутриклеточные антитела, пептидные антитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела, гетероконъюгатные антитела (например, биспецифические антитела, диатела, триатела, тетратела, тандемные ди-scFv, тандемные три-scFv) и т. п. Если не  
5  
10  
15  
указано иное, термин “антитело” следует понимать как охватывающий функциональные фрагменты антител. Применяемый авторами термин “фрагменты антител” включает искусственные белки, предназначенные для выборочного связывания антигенов, т. е., миметики антител. Как правило, одну или несколько CDR прививают к отличным от Ig каркасов, таким образом, имитируя конформации CDR из родительского антитела. Неограничивающими примерами таких миметиков антител являются флуктуационно-регулируемые аффинные белки (FLAP), монотела и аффимеры. Миметики антител включают одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR, как описано авторами.

[092] В контексте данного описания “Fab-фрагмент” является  
20  
фрагментом антитела, включающим фрагмент легкой цепи, включающий переменный легкий (VL) домен и константный домен легкой цепи (CL) и переменный тяжелый (VH) домен и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Fab-фрагмент, как правило, имеет молекулярную массу приблизительно 50 кДа и гидродинамический радиус приблизительно 3,0 нм.

[093] В контексте данного описания “одноцепочечный переменный  
25  
30  
фрагмент” (scFv) представляет собой антигенсвязывающий белок, включающий переменный домен тяжелой цепи (VH), связанный с переменным доменом легкой цепи (VL). Домены VH и VL scFv связаны через любой подходящий линкер, принятый в данной области техники. К таким линкерам относятся, помимо прочих, повторяемые аминокислотные последовательности GGGGS или их варианты. Как правило, scFv не включает области константного домена антитела, хотя scFv согласно изобретению может быть связан или прикреплен к областям константного домена антитела (например, Fc домена антитела) для изменения разных свойств scFv, включая, помимо прочего, увеличенное время

полужизни в сыворотке или ткани. Как правило, scFv имеет молекулярную массу приблизительно 25 кДа и гидродинамический радиус приблизительно 2,5 нм.

[094] В контексте данного описания “VНН”, “нанотело” или “только тяжелоцепочечное антитело” представляет собой антигенсвязывающий белок, включающий один переменный домен тяжелой цепи, взятый из вида семейства *Camelidae*, которое включает верблюдов, лам и альпака. Как правило, VНН имеет молекулярную массу приблизительно 15 кДа.

[095] Применяемый в контексте данного описания термин “определяющая комплементарность область” или “CDR” означает несвязные последовательности аминокислот в пределах переменных областей антитела, которые придают специфичность к антигену и аффинность связывания. В целом существует три CDR в каждой переменной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три CDR в каждой переменной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). “Каркасными участками” или “FR” среди специалистов в данной области техники называются отличные от CDR части переменных областей тяжелой и легкой цепей. В целом существует четыре FR в каждой переменной области тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4) и четыре FR в каждой переменной области легкой цепи (FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4). Что касается антител VНН, существует лишь три CDR тяжелой цепи и не существует ни одной CDR легкой цепи.

[096] Точные границы аминокислотной последовательности данной CDR или FR легко поддаются определению с применением любой из множества общеизвестных схем, включая описываемые в публикациях Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (нумерация согласно Кэбату), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927 - 948 (нумерация согласно Чотиа), MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262: 732 - 745 (1996), “Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography,” J. Mol. Biol. 262, 732 - 745. (“Contact” numbering scheme), Lefranc M P et al., “IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,” Dev Comp Immunol, 2003 January; 27 (1): 55 - 77 (“IMGT” numbering scheme), и Honegger A and Pluckthun A, “Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool,” J Mol Biol, 2001 Jun. 8; 309 (3): 657 - 70, (нумерация согласно АНо).

[097] Границы данных CDR или FR разнятся в зависимости от схемы, применяемой для идентификации. Например, нумерация по Кэбату основывается на структурном выравнивании, тогда как схема Чотиа основана на структурной информации. Нумерация и по Кэбату, и по Чотиа основана на наиболее часто встречающейся длине последовательности участка антитела, с инсерциями, обозначаемыми соответствующими буквами, например, “30a”, и делециями в некоторых антителах. Две схемы предполагают определенные инсерции и делеции (“инсерционно-делеционные мутации”) в разных позициях, в результате которых меняется нумерация. Контактная схема основывается на анализе сложных кристаллических структур и во многих отношениях подобна нумерации по Чотиа.

[098] Образование вариантов обеспечиваемых согласно изобретению антител возможно путем включения делеций, замен, добавлений и/или модификаций в каркасе и/или в CDR. Варианты антител затем испытывают на наличие нужной функции с применением описываемых вторыми способами. Возможны любые комбинации делеций, замещений, добавлений, модификаций и инсерций в антигенсвязывающем белке или его фрагменте, при условии, что образовавшийся вариант обладает нужными характеристиками, на наличие которых его отбирают с применением соответствующих способов.

[099] В контексте данного описания “консервативное замещение” означает модификацию, которая сохраняет функциональные свойства родительского антитела. Например, консервативные аминокислотные замещения включают замещения, в которых аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, обладающий подобными свойствами. Например, замещение аланина (A) валином (V); замещение аргинина (R) лизином (K); замещение аспарагина (N) глутамином (Q); замещение аспарагиновой кислоты (D) глутаминовой кислотой (E); замещение цистеина (C) серином (S); замещение глутаминовой кислоты (E) аспарагиновой кислотой (D); замещение глицина (G) аланином (A); замещение гистидина (H) аргинином (R) или лизином (K); замещение изолейцина (I) лейцином (L); замещение метионина (M) лейцином (L); замещение фенилаланина (F) тирозином (Y); замещение серина (S) треонином (T); замещение триптофана (W) тирозином (Y); замещение фенилаланина (F) триптофаном (W); и/или замещение валина (V) лейцином (L) и наоборот.

[0100] Таким образом, если не указано иное, "CDR" или "определяющая комплементарность область" или отдельные указанные CDR (например, "CDR-H1, CDR-H2), данного антитела или его области, такой как его переменная область, следует понимать как охватывающие (специфическую) определяющую комплементарность область согласно определению с применением одной из известных схем. Подобным образом, если не указано иное, "FR" или "каркасный участок" или отдельные указанные FR (например, "FR-H1", "FR-H2") данного антитела или его области, такие как его переменная область, следует понимать как охватывающие (специфический) каркасный участок согласно определению с применением одной из известных схем. В некоторых случаях указывают схему идентификации конкретных CDR или FR, например, CDR, как определено способом Кэбата, Чотиа, контактным способом, IMGT или АНо. В других случаях представлена конкретная аминокислотная последовательность CDR или FR. Нумерация CDR или FR дополнительно описана в публикациях Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (нумерация по Кэбату), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927 - 948 (нумерация по Чотиа), MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262: 732 - 745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography," J. Mol. Biol. 262, 732 - 745. (контактная нумерация), Lefranc M P et al., "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," Dev Comp Immunol, 2003 January; 27 (1): 55 - 77 (нумерация IMGT), и Honegger A and Pluckthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool," J Mol Biol, 2001 Jun. 8; 309 (3): 657 - 70, (нумерация АНо).

[0101] Термины "конкурировать" или "перекрестно конкурировать" в данном описании применяются взаимозаменяемо и касаются способности молекулы антитела к препятствованию связыванию молекулы антитела, например, антигенсвязывающих белков, как описано авторами, с мишенью, например, С3 и/или С3b человека. Препятствование связыванию бывает прямым или косвенным (например, через аллостерическую модуляцию антигенсвязывающей молекулы или мишени). Степень, в которой антигенсвязывающая молекула способна препятствовать связыванию другой антигенсвязывающей молекулы с мишенью, и, таким образом, является ли она

способной к конкуренции, определяют с применением анализ конкурентного связывания, например, анализов FACS, ELISA или BIACORE. В некоторых вариантах осуществления анализ конкурентного связывания является количественным конкурентным анализом. В некоторых вариантах осуществления первую антигенсвязывающую молекулу определяют как конкурирующую за связывание с мишенью со второй антигенсвязывающей молекулой, если связывание первой молекулы антитела с мишенью снижается на 10 % или более, например, 20 % или более, 30 % или более, 40 % или более, 50 % или более, 55 % или более, 60 % или более, 65 % или более, 70 % или более, 75 % или более, 80 % или более, 85 % или более, 90 % или более, 95 % или более, 98 % или более, 99 % или более согласно анализу конкурентного связывания (например, описанному авторами конкурентному анализу).

[0102] Применяемый в контексте данного описания термин “аффинность” касается силы взаимодействия между антигенсвязывающим сайтом антитела и эпитопом, с которым он связывается. Как легко станет понятно специалистам в данной области техники, аффинность антитела или антигенсвязывающего белка может быть указана как константа диссоциации ( $K_D$ ) в молярности (М). В возможных вариантах антитела согласно изобретению имеют значения  $K_D$  в диапазоне от  $10^{-5}$  до  $10^{-12}$  М. Высокоаффинные антитела имеют значения  $K_D$   $10^{-9}$  М (1 наномоль, нМ) и ниже. Например, в возможном варианте высокоаффинное антитело имеет значение  $K_D$  в диапазоне от приблизительно 1 нМ до приблизительно 0,01 нМ. В возможном варианте высокоаффинное антитело имеет значение  $K_D$  приблизительно 1 нМ, приблизительно 0,9 нМ, приблизительно 0,8 нМ, приблизительно 0,7 нМ, приблизительно 0,6 нМ, приблизительно 0,5 нМ, приблизительно 0,4 нМ, приблизительно 0,3 нМ, приблизительно 0,2 нМ или приблизительно 0,1 нМ. Очень высокоаффинные антитела имеют значения  $K_D$   $10^{-12}$  М (1 пикомоль, пМ) и ниже. Слабо- или низкоаффинные антитела в возможных вариантах имеют значения  $K_D$  в диапазоне от  $10^{-1}$  до  $10^{-4}$  М. В возможных вариантах низкоаффинные антитела имеют значения  $K_D$   $10^{-4}$  М и выше, например,  $10^{-4}$  М,  $10^{-3}$  М,  $10^{-2}$  М или  $10^{-1}$  М.

[0103] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению имеют связывающую аффинность к С3 и С3b от приблизительно  $10^{-8}$  М до приблизительно  $10^{-14}$  М. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению имеют

связывающую аффинность к С3 и С3b от приблизительно  $10^{-10}$  М до приблизительно  $10^{-12}$  М. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению имеют связывающую аффинность к С3 и С3b по меньшей мере приблизительно  $10^{-8}$  М, по меньшей мере 5 по меньшей мере приблизительно  $10^{-9}$  М, по меньшей мере приблизительно  $10^{-10}$  М, по меньшей мере приблизительно  $10^{-11}$  М или по меньшей мере приблизительно  $10^{-12}$  М.

[0104] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет приблизительно эквивалентную связывающую аффинность к С3 и С3b. В качестве неограничивающего примера в возможном варианте антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет связывающую аффинность к С3 приблизительно  $10^{-10}$  М и связывающую аффинность к С3b приблизительно  $10^{-10}$  М. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет связывающую аффинность к 15 С3 приблизительно  $10^{-11}$  М и связывающую аффинность к С3b приблизительно  $10^{-11}$  М. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет связывающую аффинность к С3 приблизительно  $10^{-12}$  М и связывающую аффинность к С3b приблизительно  $10^{-12}$  М.

[0105] В некоторых вариантах осуществления связывающая аффинность к С3 находится в пределах одного порядка по отношению к связывающей аффинности к С3b. В качестве неограничивающего примера в возможном варианте антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет связывающую аффинность к С3 приблизительно  $10^{-10}$  М и связывающую аффинность к С3b приблизительно  $10^{-11}$  М. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет связывающую аффинность к 25 С3 приблизительно  $10^{-11}$  М и связывающую аффинность к С3b приблизительно  $10^{-12}$  М.

[0106] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет перекрестную реактивность с С3 яванского макака. С3 яванского макака (*Macaca fascicularis*) является на 95,1 % идентичным человеческому С3 и перекрестная реактивность позволяет осуществлять доклинические и токсикологические испытания антигенсвязывающих белков согласно изобретению в соответствующей 30 животной модели.

[0107] Во избежание неопределенности следует уточнить, что если не  
указано иное, С3 в контексте данного описания относится к человеческому  
компоненту 3 комплемента UniProt P01024 и нуклеиновокислотной  
последовательности, кодирующей этот белок. С3b происходит от нативного С3 и  
5 является большим из двух элементов, образованных путем расщепления С3.

[0108] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие  
белки согласно изобретению являются моновалентными и связываются с  
человеческим С3 и С3b с  $K_D$  приблизительно 200 нМ или меньше согласно  
измерению путем биослойной интерферометрии (БСИ). В некоторых вариантах  
10 осуществления  $K_D$  составляет приблизительно 200 пМ или меньше, например,  
приблизительно 100 пМ, приблизительно 10 пМ, приблизительно 1 пМ или  
приблизительно 0,1 пМ.

[0109] Способность антигенсвязывающего домена к связыванию со  
специфической антигенной детерминантой измеряют либо путем твердофазного  
15 иммуноферментного анализа (ELISA), либо с применением других технологий,  
знакомых специалистам в данной области техники, например, технологии  
поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (анализируемого при помощи  
инструмента VIAcore) (Liljeblad et al., Glyco J 17, 323 - 329 (2000)) и  
традиционных анализов связывания (Heeley, Endocr Res 28, 217 - 229 (2002)).

#### 20 Антигенсвязывающие белки против комплемента С3

[0110] В одном аспекте изобретение обеспечивает антигенсвязывающие  
белки со специфичностью связывания с белком комплемента С3. В некоторых  
вариантах осуществления антигенсвязывающими белками против С3 являются  
scFvs, Fab-фрагменты или VHH.

25 [0111] Примеры CDR антигенсвязывающих белков против С3  
представлены ниже в Таблице 1. Примеры переменных тяжелых и  
переменных легких доменов антигенсвязывающих белков против С3  
представлены ниже в Таблице 2. Представленные ниже типичные  
антигенсвязывающие белки против С3 вырабатывали путем иммунизации  
30 кроликов и лам человеческим белком С3, выделенным из человеческой плазмы.  
Типичные VH и VL домены M0122, M0123 и M0124 получали от кроликов,  
иммунизированных человеческим белком С3, и они являются  
последовательностями кролика дикого типа. Типичные домены VHH M0228 и

M0251 получали от лам, иммунизированных человеческим белком С3, и они являются последовательностями ламы дикого типа.

[0112] Таблица 1 – Последовательности CDR антигенсвязывающего белка против С3.

SEQ ID NO:	Последовательность	Обозначение
1	DYTMG	M0228_CDR-H1
2	AINWRGSSTYYADSVKG	M0228_CDR-H2
3	QVSPYVELTATAAY	M0228_CDR-H3
4	NWAMG	M0251_CDR-H1
5	AIRWSVGTTNYRDSVKG	M0251_CDR-H2
6	GTPFVLARINGYDY	M0251_CDR-H3
7	NYAMN	M0122_CDR-H1
8	IINTDGNTNYASWAKG	M0122_CDR-H2
9	AVGYHHHALDP	M0122_CDR-H3
10	TLSSAHKTYTID	M0122_CDR-L1
11	LKSDGSYTKGT	M0122_CDR-L2
12	GTDYGGGYV	M0122_CDR-L3
13	SYHMS	M0123_CDR-H1
14	IITYTDGNTDYANWAKG	M0123_CDR-H2
15	RGYADYGYTFNL	M0123_CDR-H3
16	TADTLSRNYAS	M0123_CDR-L1
17	RDTSRPS	M0123_CDR-L2
18	ATGDGSGSSYQFV	M0123_CDR-L3
19	RYWMN	M0124_CDR-H1
20	YITTNDKTYANWAKG	M0124_CDR-H2
21	RSSGAYDI	M0124_CDR-H3
22	TLSSAHKTYIE	M0124_CDR-L1
23	LKSDGTYTKGT	M0124_CDR-L2
24	GVTGGNVYV	M0124_CDR-L3

5

[0113] Таблица 2 – VH / VL последовательности антигенсвязывающего белка против С3.

SEQ ID NO:	Последовательность	Обозначение
25	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTINDYTMGW FRQAPGKDFVSAINWRGSSTYYADSVKGRFTISR NAKKTIIYLMNLLKPEDTAVYYCARQVSPYVELTAT AAWYWGQGTQVTVSS	M0228_VHH
26	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGHTFGNWAMG WFRQAPGKEREVGAIRWSVGTTNYRDSVKGRFAISR DNARNTVYLMNRLKPEDTAVYYCAAGTPFVLARIN GYDYWGQGTQVTVSS	M0251_VHH
27	QSVKESGGRLVTPGTPPLTLCTVSGFSLYNYAMNWVR QAPGKGLEWIGIINTDGNTNYASWAKGRFTISTTSSTT VDLKITSPTTEDTATYFCPRAVGYHHHALDPWGPGLT VTVSS	M0122_VH

28	ELVLTQSPSVSAALGASAKLTCTLSSAHKTYTIDWYQ QQQGEAPRYLMQLKSDGSYTKGTGVPDRFSGSSSGA DRYLIIPSVQADDEADYYCGTDYGGGYVFGGGTQLTV TG	M0122_VL
29	QSVKESEGRLVTPGTPLTLTCTASGFTIGSYHMSWVR QAPGKGLEWIGIYTDGNTDYANWAKGRFTISKTSST MDLKMTSLTAADTATYFCARRGYADYGYTFNLWGQ GTLVTISS	M0123_VH
30	ELVLTQPASVQVNLGQTVSLTCTADTLRNYASWYQ QKPGQAPVLLIYRDTSRPSGVPDRFSGSSSGNTATLTIS GAQAGDEADYYCATGDGSGSSYQFVFGGGTQLTVTG	M0123_VL
31	QSVKESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSRYWMNWVR QAPGKGLEWIGYITNDKTYANWAKGRYTISKTSST TVDLKMTSLTTEDTATYFCARRSSGAYDIWGPGLVT ISS	M0124_VH
32	QPVLTPSPASATLGASAKLTCTLSSAHKTYIEWYQ QQQGEAPRYLMQLKSDGTYTKGTGVPDRFSGSSSGA DRYLIISVQAEDEADYICGVTGGNVYVFGGGTQLTV TG	M0124_VL

[0114] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки против С3 согласно изобретению имеют по меньшей мере приблизительно 80 %, по меньшей мере приблизительно 80 %, по меньшей мере приблизительно 85 %, по меньшей мере приблизительно 90 %, по меньшей мере приблизительно 95 %, по меньшей мере приблизительно 96 %, по меньшей мере приблизительно 97 %, по меньшей мере приблизительно 98 %, по меньшей мере приблизительно 99 % или 100 % подобия или идентичности последовательности с любой из последовательностей из Таблицы 1 или Таблицы 2.

[0115] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки против С3 согласно изобретению отбирают на их способность к ингибированию одного или нескольких путей активации комплемента – классического пути, альтернативного пути и лектинового пути. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки против С3 согласно изобретению отбирают на их способность к ингибированию всех трех путей активации комплемента – классического пути, альтернативного пути и лектинового пути. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки против С3 согласно изобретению способны ингибировать все три пути активации комплемента в глазу. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки против С3 согласно изобретению способны ингибировать все три пути активации комплемента в области сосудистой оболочки глаза. Область сосудистой оболочки представляет собой слой,

содержащий кровеносные сосуды, который выстилает заднюю часть глаза и расположен между сетчаткой и склерой. Область сосудистой оболочки разделена на четыре слоя: слой Галлера, слой Заттлера, хориокапилляр и оболочка Бруха. Оболочка Бруха, также известная как стекловидная пластинка, является самым

5 дальним внутренним слоем сосудистой оболочки и прилегает к пигментному эпителию сетчатки (ПЭС). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки против C3 согласно изобретению способны проникать или диффундировать через оболочку Бруха и попадать в другие слои

10 [0116] Сетчатка имеет существенные физические барьеры, способные препятствовать проникновению больших молекул, таких как иммуноглобулины полной длины, в более глубокие слои, в результате чего возможно снижение терапевтического эффекта (Jackson et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003; 44 (5): 2141 - 6). Меньшие же производные антитела способны проникать глубже в

15 сетчатку. Типичными производными антител, имеющими молекулярную массу приблизительно 60 кДа или меньше, являются фрагменты антител, включая, помимо прочего, Fab, Fab'-фрагмент, scFab, scFv, Fv-фрагмент, нанотело, VHH, dAb, V-Nar, sdAb, sdFv и биспецифические и бивалентные антитела, такие как одноцепочечное диатело (scDb) или DART. В некоторых вариантах

20 осуществления антигенсвязывающие белки против C3 согласно изобретению имеют молекулярную массу приблизительно 60 кДа или меньше, например, приблизительно 55 кДа, приблизительно 50 кДа, приблизительно 45 кДа, приблизительно 40 кДа, приблизительно 35 кДа, приблизительно 30 кДа, приблизительно 25 кДа, приблизительно 20 кДа, приблизительно 15 кДа или

25 меньше.

[0117] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки против C3 согласно изобретению способны проникать или диффундировать через оболочку Бруха частично благодаря их размеру, который достаточно мал, чтобы способствовать проникновению. В некоторых вариантах

30 осуществления размер антигенсвязывающих белков согласно изобретению измеряют по молекулярной массе. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению имеют молекулярную массу, меньшую, чем приблизительно 60 кДа. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению имеют молекулярную массу

от приблизительно 20 кДа до приблизительно 30 кДа или от приблизительно 10 кДа до приблизительно 20 кДа. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению имеют молекулярную массу приблизительно 25 кДа. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению имеют молекулярную массу приблизительно 15 кДа. В некоторых вариантах осуществления размер антигенсвязывающих белков согласно изобретению измеряют по их гидродинамическому радиусу. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению имеют гидродинамический радиус, меньший или равный приблизительно 3,0 нм. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению имеют гидродинамический радиус, меньший или равный приблизительно 2,5 нм. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению имеют гидродинамический радиус, меньший или равный приблизительно 2,0 нм.

[0118] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки одним или несколькими антигенсвязывающими белками, включая M0122, M0123, M0124, M0228 и M0251. Конкуренцию антитела измеряют с применением любого анализа, известного специалистам в данной области техники. В некоторых возможных вариантах осуществления одно антитело метят маркером, таким как биотин, и инкубируют вместе с другими антителами против C3 в ELISA-анализе связывания C3. Как правило, если конкурирующий антигенсвязывающий белок присутствует в избыточном количестве, это уменьшает специфическое связывание описываемого авторами антигенсвязывающего белка или его фрагмента с C3 и/или C3b, т. е., перекрестно блокирует связывание по меньшей мере на 40 - 45 %, 45 - 50 %, 50 - 55 %, 55 - 60 %, 60 - 65 %, 65 - 70 %, 70 - 75 % или 75 % или более. В некоторых вариантах осуществления связывание описываемого авторами антигенсвязывающего белка или его фрагмента в присутствии конкурирующего антигенсвязывающего белка уменьшается по меньшей мере на 80 - 85 %, 85 - 90 %, 90 - 95 %, 95 - 97 % или 97 % или более.

[0119] Комплемент C3 представляет собой большой белок, состоящий из 13 разных доменов и имеющий размер молекулы 185 кДа. Во время активации комплемента C3 подвергается протеолитическому расщеплению и структурным

модификациям в разных местах. Производные от C3 фрагменты обеспечивают различные эффекторные функции и образуют конвертазы, которые активизируют петли амплификации трех путей активации комплемента. Классический путь и лектиновый путь C3-конвертаза, C4bC2a, расщепляет C3 5 полной длины на C3b и анафилатоксин C3a. Альтернативный путь также вырабатывает C3b и C3a, но с использованием C3-конвертазы альтернативного пути, C3bBb. Кроме того, в путях активации комплемента возможно образование дополнительных продуктов распада C3. Фактор комплемента I (CFI) является сериновой протеазой плазмы, способной необратимо инактивировать C3b до 10 iC3b. Затем iC3b дополнительно расщепляют на фрагменты (C3dg и C3c) при помощи CFI. Дополнительный протеолитический продукт C3, C3d, связывает рецептор 2 комплемента (CR2) и способен играть важную роль в контроле клеточного цикла В-клеток. Вместе с производными от C3 белковыми продуктами пути активации комплемента включают, помимо прочих, C1, C2, C4, 15 C4b, C4a C5, C5b, C5a, C6, C7, C8, C9, C1q, C1r, C1s, Фактор В, Фактор D, Фактор Р, Фактор Н, Фактор I, CD46 (МКБ), CD55 (DAF), CD59 (МАК-IP), CR1 (CD35), CR2 (CD21), CR3, CR4, C3aR, C5aR1, C5aR2, CRIg,  $\alpha$ -цепь C4BP,  $\beta$ -цепь C4BP, фиколин-1, маннозосвязывающий лектин (МСЛ), МСЛ-ассоциированную сериновую протеазу-1 (MASP-1) и МСЛ-ассоциированную сериновую протеазу-2 20 (MASP-2). Путь активации комплемента и разные компоненты пути активации комплемента более подробно описаны в публикации Noris et al. *Semin Nephrol.* 2013; 33 (6): 479 – 492.

[0120] В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антигенсвязывающие белки против C3, способные связывать C3 и C3b. В 25 некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки против C3 согласно изобретению имеют связывающую аффинность к C3a, iC3b, C4, C4b, C5 и/или C5b, более слабую, чем связывающая аффинность к C3 и C3b. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки против C3 согласно изобретению имеют связывающую аффинность к C3a, iC3b, C4, C4b, 30 C5 и/или C5b приблизительно  $10^{-4}$  М или слабее. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки против C3 согласно изобретению не имеют связывающей аффинности к C3a, iC3b, C4, C4b, C5 и/или C5b. В контексте данного описания выражение “не имеют связывающей аффинности” относится к обнаружимой аффинности связывания относительно фоновой при

применении одного или нескольких анализов аффинности связывания, известных специалистам в данной области техники, включая, помимо прочих, анализ ELISA.

5 [0121] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки способны связывать эпитоп на комплементе C3, причем такое связывание предотвращает образование C3-конвертазы. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению ингибируют активность C3-конвертазы. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению ингибируют петлю  
10 амплификации C3-конвертазы.

[0122] В некоторых вариантах осуществления ожидается, что антитела против C3 согласно изобретению должны иметь большую эффективность и безопасность в лечении ГА или других офтальмологических нарушений по сравнению с другими терапевтическими средствами благодаря описываемым  
15 ниже свойствам.

[0123] Антитела против C3 согласно изобретению включают, помимо прочих, фрагменты антител scFv и VHH с молекулярной массой менее чем приблизительно 60 кДа. В качестве неограничивающего примера scFv согласно изобретению имеет молекулярную массу приблизительно 25 кДа, а VHH согласно изобретению имеет молекулярную массу приблизительно 15 кДа, тогда  
20 как другие терапевтические средства могут иметь большую молекулярную массу. На основании оценки гидродинамического радиуса ожидается, что антитела против C3 согласно изобретению должны лучше ингибировать C3 для сосудистой оболочки, поскольку они эффективнее преодолевают оболочку Бруха и проникают в сосудистую оболочку глаза.  
25

[0124] Антитела против C3 согласно изобретению имеют терапевтически эффективный срок действия более 1 месяца, более длительный по сравнению с другими терапевтическими средствами. Увеличенный терапевтически эффективный срок действия, возможно, обусловлен молярной концентрацией антител против C3 согласно изобретению, которая достигает 7 мМ.  
30

[0125] Антитела против C3 согласно изобретению легче поддаются инъекции в глаз по сравнению с другими терапевтическими средствами. Антитела против C3 согласно изобретению не содержат ПЭГ, что снижает их вязкость. Таким образом, ожидается, что вязкость антител против C3 согласно

изобретению должна быть ниже, чем у других терапевтических средств. Растворы со сниженной вязкостью, такие как растворы с вязкостью, меньшей или равной 20 сантипуаз (сП), легче поддаются инъекции в глаз благодаря меньшему противодействию.

5            Экспрессия антигенсвязывающего полипептида

[0126] В одном аспекте обеспечиваются полинуклеотиды, которые кодируют описываемые авторами связывающие полипептиды (например, антигенсвязывающие белки). Также обеспечиваются способы получения связывающего полипептида, включающие экспрессию этих полинуклеотидов.

10           [0127] Полинуклеотиды, кодирующие описываемые авторами связывающие полипептиды, как правило, вставляют в вектор экспрессии для введения в клетки-хозяева, которые используют для выработки нужного количества заявленных антител или их фрагментов. Соответственно, в некоторых аспектах изобретение обеспечивает векторы экспрессии,  
15           включающие описываемые авторами полинуклеотиды и клетки-хозяева, включающие эти векторы и полинуклеотиды.

[0128] В контексте данного описания термин “вектор” или “вектор экспрессии” означает векторы, применяемые в соответствии с настоящим изобретением в качестве носителя для введения в нужный ген и его экспрессии в  
20           клетке. Как известно специалистам в данной области техники, такие векторы выбирают из группы, к которой относятся плазмиды, фаги, вирусы и ретровирусы. Как правило, векторы, совместимые с данным изобретением, включают селективный маркер, соответствующие сайты рестрикции для содействия клонированию нужного гена и возможности проникновения и/или  
25           репликации в эукариотных или прокариотных клетках.

[0129] С точки зрения данного изобретения возможно применение многих систем векторов экспрессии. Например, в одном классе вектора используют элементы ДНК, производные от вирусов животных, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус полиомы, аденовирус, вирус  
30           вакцины, бакуловир, ретровирусы (например, RSV, MMTV, MOMLV и т. п.) или вирус SV40. Другие включают применение полицистронных систем с внутренними участками связывания рибосом. Кроме того, клетки с включенной в их хромосомы ДНК отбирают путем введения одного или нескольких маркеров, обеспечивающих возможность отбора трансфицированных клеток-

хозяев. Маркер может обеспечивать прототрофность для ауксотрофного хозяина, резистентность к биоцидам (например, антибиотикам) или устойчивость к воздействию тяжелых металлов, таких как медь. Селектируемый маркерный ген либо непосредственно связывают с экспрессируемыми последовательностями ДНК, либо вводят в ту же клетку путем котрансформации. Для оптимального синтеза мРНК также могут потребоваться дополнительные элементы. К этим элементам относятся сигнальные последовательности, сигналы сплайсинга, а также транскрипционные промоторы, энхансеры и сигналы терминации. В некоторых вариантах осуществления клонируемые гены переменной области вставляют в вектор экспрессии вместе с генами константной области тяжелой и легкой цепи (например, генами константной области человека), синтезируемыми, как обсуждалось выше.

[0130] В других вариантах осуществления связывающие полипептиды экспрессируют с использованием полицистронных конструктов. В таких системах экспрессии возможно получение множества нужных генных продуктов, таких как тяжелые и легкие цепи антител, из одного полицистронного конструкта. Эти системы позволяют воспользоваться участком внутренней посадки рибосомы (IRES) для обеспечения относительно высокого уровня полипептида в эукариотных клетках-хозяевах. Совместимые последовательности IRES раскрываются в Патенте США № 6,193,980, включенном в данный документ путем ссылки в полном объеме во всех отношениях. Специалистам в данной области техники станет понятна возможность применения таких систем экспрессии для эффективного продуцирования полного диапазона полипептидов, раскрываемых в данной заявке.

[0131] В общих чертах, сразу после создания вектора или последовательности ДНК, кодирующей антитело, или ее фрагмента появляется возможность введения вектора экспрессии в соответствующую клетку-хозяин. То есть, возможность трансформации клеток-хозяев. Введение плазмиды в клетку-хозяин выполняют различными способами, которые общеизвестны среди специалистов в данной области техники. К ним относятся, помимо прочего, трансфекция (включая электрофорез и электропорацию), слияние протопластов, осаждение фосфатом кальция, слияние клетки с оболочечной ДНК, микроинъекция и инфицирование интактным вирусом. См. Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, pp. 470 - 472 Vectors, Rodriguez and

Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). Введение плазмиды в клетку-хозяин возможно путем электропорации. Трансформированные клетки выращивают в условиях подходящих для создания легких цепей и/или тяжелых цепей, и анализируют на синтез тяжелоцепочечного и/или легкоцепочечного белка. Примеры технологий анализа включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунный анализ (RIA), клеточный сортировщик с активацией флуоресценции (FACS), иммуногистохимия и т. п.

[0132] Применяемый в контексте данного описания термин “трансформация” употребляется в широком смысле и касается введения экзогенной ДНК в реципиентную клетку-хозяин, которое изменяет генотип и вследствие этого приводит к изменению реципиентной клетки. В возможном варианте генетически модифицированная реципиентная клетка содержит экзогенные последовательности в результате временной или стабильной трансформации. Например, экзогенные последовательности стабильно интегрируют в геномную последовательность реципиентной клетки в целевом сайте или случайном сайте. Клетки, модифицируемые способами редактирования гена (например, способами с применением гомологичной рекомбинации, транспозон-опосредованной системы, системы loxP-Cre, CRISPR/Cas9 или TALEN) охватываются объемом настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления стабильную линию клеток генерируют для продуцирования антигенсвязывающего белка или его фрагмента. В результате обеспечивается преимущество, состоящее в устойчивом продуцировании антигенсвязывающих белков или их фрагментов однородного качества и количества на выходе.

[0133] Аналогично “клетки-хозяева” означают клетки, которые были трансформированы векторами, построенными с применением технологий рекомбинантных ДНК и кодирующими по меньшей мере один гетерологичный ген. В описаниях процессов выделения полипептида из рекомбинантных хозяев термины “клетка” и “культура клеток” применяются взаимозаменяемо для обозначения источника антитела, если прямо не указывается иное. Другими словами, извлечение полипептида из “клеток” означает либо извлечение из центрифугированных цельных клеток, либо из культуры клеток, содержащей и среду, и суспендированные клетки.

[0134] В одном варианте осуществления линия клеток-хозяев, применяемая для экспрессии антитела, взята из организма млекопитающего. Специалисты в данной области техники смогут определить конкретные линии клеток-хозяев, наиболее подходящие для нужного генного продукта, предназначенного для экспрессии в них. К типичным линиям клеток-хозяев относятся, помимо прочих, DG44 и DUXB11 (линии яичника китайского хомячка, DHFR-минус), HELA (карцинома шейки матки человека), CV-1 (линия почек макака), COS (производное CV-1 с антигеном SV40 T), R1610 (фибробласты китайского хомячка) BALBC/3T3 (фибробласты мыши), НАК (линия почек хомяка), SP2/O (миелома мыши), BFA-1c1BPT (эндотелиальные клетки крупного рогатого скота), RAJI (лимфоциты человека), 293 (почки человека) и т.п. В одном варианте осуществления линия клеток обеспечивает измененное гликозилирование, например, афукозилирование, экспрессированного из нее антитела (например, линии PER.C6® (Crucell) или FUT8-нокаутных клеток CHO (клетки Potelligent®) (Biowa, Princeton, Нью-Джерси, США)). Линии клеток-хозяев, как правило, получают из коммерческих источников, например, от Американской коллекции типовых тканевых культур, или из опубликованных литературных источников.

[0135] *In vitro* продуцирование обеспечивает возможность увеличения масштабов для получения большого количества нужного полипептида. Технологии культивации клеток млекопитающих в условиях тканевых культур известны специалистам в данной области техники и включают гомогенную суспензионную культуру, например, в аэролитном реакторе или в реакторе с непрерывным перемешиванием, или культуру иммобилизованных или захваченных клеток, например, в полых волокнах, микрокапсулах, на агарозных микросферах или керамических картриджах. Если необходимо и/или желательно, растворы полипептида очищают с применением традиционных способов хроматографии, например, гель-фильтрации, ионообменной хроматографии, хроматографии над DEAE-целлюлозой и/или (иммуно-) аффинной хроматографии.

[0136] Гены, кодирующие антигенсвязывающие белки, характерные для данного изобретения, также экспрессируются в клетках отличных от млекопитающих организмов, таких, как бактерии или дрожжи, или клетки насекомых или растений. В этом отношении следует отметить возможность

трансформации также различных одноклеточных, отличных от млекопитающих микроорганизмов, таких как бактерии, т. е., тех, которые способны расти в культурах или ферментации. К бактериям, восприимчивым к трансформации, относятся представители энтеробактерий, такие как штаммы *Escherichia coli* или *Salmonella*; *Bacillaceae*, такие как *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*; и *Haemophilus influenzae*. Также следует отметить, что при экспрессии в бактериях белки могут становиться частью телец включений. Белки должны быть выделены, очищены и затем собраны в функциональные молекулы.

[0137] Помимо прокариотов, также возможно использование эукариотных микробов. *Saccharomyces cerevisiae* или обычные пекарские дрожжи, наиболее часто используют среди эукариотных микроорганизмов, хотя распространенными являются и множество других штаммов. Для экспрессии в *Saccharomyces* обычно используют плазмиду YRp7, например (Stinchcomb et al., Nature, 282: 39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7: 141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10: 157 (1980)). Эта плазида уже содержит ген TRP1, который обеспечивает селективный маркер для мутантного штамма дрожжей, который не способен расти в триптофане, например ATCC № 44076 или PER4-1 (Jones, Genetics, 85: 12 (1977)). Наличие повреждения *trp1* в качестве характеристики генома дрожжевой клетки-хозяина в таком случае обеспечивает эффективную среду для обнаружения трансформации по росту в отсутствие триптофана.

[0138] Таким образом, в одном аспекте обеспечивается способ производства антигенсвязывающего белка или его фрагмента, как описано выше, состоящий из следующих этапов:

- I) культивирования клетка-хозяина в условиях, обеспечивающих возможность экспрессии описанного авторами белка; и
- II) извлечения белка; и, необязательно
- III) дальнейшей очистки и/или модифицирования и/или рецептирования белка.

#### Способы введения антигенсвязывающих белков

[0139] Способы получения и введения антигенсвязывающих белков (например, раскрываемых авторами антигенсвязывающих белков) субъекту являются общеизвестными среди специалистов в данной области техники или могут быть легко ими определены. Возможными путями введения антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению являются

пероральный, парентеральный, ингаляция, местный или внутриглазной. Применяемый авторами термин "парентеральный" включает внутривенный, внутриартериальный, внутрибрюшинный, внутримышечный, подкожный, ректальный или вагинальный путь введения. Применяемый авторами термин "внутриглазной" включает, помимо прочих, субконъюнктивальный, интравитреальный, ретробульбарный или интракамеральный. Применяемый авторами термин "местный" охватывает, помимо прочих, введение с жидкими или приготовленными в форме раствора глазными каплями, эмульсиями (например, эмульсий типа "масло в воде"), суспензиями и мазями.

10 [0140] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению вводят внутриглазным путем. Доставка терапевтических соединений в разные структуры глаза, такие как сетчатка, является проблематичной. Проблемы включают, помимо прочих, несколько ограничительных глазных барьеров, слезные механизмы, включая моргание и  
15 вымывание доставленных соединений, ограниченные объемы местных инъекций, ограниченная местная биодоступность и низкая переносимость примесей и загрязнителей (см., например, Patel et al. World J Pharmacol. 2013; 2 (2): 47 – 64; Morrison et al. Ther. Deliv. 2014; 5 (12): 1297 - 1315). Антигенсвязывающие белки согласно изобретению позволяют преодолевать эти проблемы.

20 Антигенсвязывающие белки согласно изобретению имеют молекулярную массу приблизительно 60 кДа или меньше. Примерами антигенсвязывающих белков с молекулярной массой приблизительно 60 кДа или меньше являются, помимо прочих, scFv, V<sub>H</sub>H и Fab-фрагменты. Меньший размер антигенсвязывающих белков согласно изобретению относительно антител полной длины обеспечивает  
25 возможность доставки большего количества терапевтического антитела за одну инъекцию. Это позволяет вводить в глаз высокую концентрацию антител. Меньший размер антигенсвязывающих белков согласно изобретению также позволяет улучшить их проникновение в связанные с заболеванием ткани, т. е., область сосудистой оболочки глаза. Антигенсвязывающие белки способны  
30 проникать через один или несколько слоев участка сосудистой оболочки, включая слой Галлера, слой Заттлера, хориокапилляр и оболочку Бруха, таким образом, нацеливаясь на комплемент C3 и C3b в пределах этих слоев участка сосудистой оболочки.

[0141] В некоторых вариантах осуществления внутриглазное введение выполняют при помощи устройства для доставки лекарственных средств, такого как устройство для супрахориоидальной доставки лекарственных средств или устройство для субретинальной доставки лекарственных средств. Процедуры супрахориоидального введения включают введение лекарственного средства в супрахориоидальное пространство глаза и, как правило, их выполняют с применением устройства для супрахориоидальной доставки лекарственных средств, такого как микроинъектор с микроиглой (см., например, публикации Hariprasad, Retinal Physician; 2016; 13: 20 - 23; Goldstein, 2014, Retina Today 9 (5): 82 - 87; каждая из которых включена путем ссылки в полном объеме). К устройствам для супрахориоидальной доставки лекарственных средств, которые применяют для откладывания антигенсвязывающих белков согласно изобретению в супрахориоидальное пространство относятся, помимо прочих, устройства для супрахориоидальной доставки лекарственных средств, производимые Clearside® Biomedical, Inc. (см., например, Hariprasad, 2016, выше). К устройствам для субретинальной доставки лекарственных средств, которые применяют для откладывания антигенсвязывающих белков согласно изобретению в субретинальном пространстве через супрахориоидальное пространство, относятся, помимо прочих, устройства для субретинальной доставки лекарственных средств, производимые Janssen Pharmaceuticals, Inc. (см., например, Публикацию международной патентной заявки № WO 2016/040635).

[0142] В некоторых вариантах осуществления внутриглазное введение выполняют интравитреальным путем. Интравитреальное введение часто выполняют с применением шприца и иглы калибра от 27-го до 30-го (см., например, Jiang et al. выше).

[0143] Хотя все эти формы введения четко рассматриваются как охватываемые объемом настоящего изобретения, предусмотренной формой введения является раствор для инъекций, в частности, для интравитреальной инъекции. Как правило, подходящая фармацевтическая композиция для инъекций включает буфер (например, ацетатный, фосфатный или цитратный буфер), поверхностно-активное вещество (например, полисорбат), необязательно стабилизатор (например, человеческий альбумин) и т. п. Однако в других способах, совместимых с изложенной авторами идеей изобретения, доставка

модифицированных антител возможна непосредственно к месту неблагоприятной клеточной популяции, что увеличивает воздействие терапевтического агента на пораженную ткань.

[0144] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению рецептируют в растворе с низкой вязкостью. Вязкость раствора измеряют в сантипуазах (сП). Высокая вязкость растворов антител бывает проблематичной с точки зрения введения антигенсвязывающих белков согласно изобретению в глаз. Например, растворы с вязкостью свыше 50 сП трудно поддаются введению через тонкую иглу из-за высокого противодавления. Таким образом, желательно рецептировать антигенсвязывающие белки согласно изобретению в растворе низкой вязкости. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению и их фармацевтические композиции имеют вязкость от приблизительно 1 сП до приблизительно 50 сП. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению и их фармацевтические композиции имеют вязкость, меньшую или равную приблизительно 20 сП, приблизительно 15 сП, приблизительно 10 сП, приблизительно 5 сП, приблизительно 4 сП, приблизительно 3 сП, приблизительно 2 сП или приблизительно 1 сП. Другие детали, касающиеся вязкости антитела, описаны в публикации Tomar et al. MAbs. 2016; 8 (2): 216 – 228 and Fennell et al. MAbs. 2013; 5 (6): 882 – 895.

[0145] К препаратам для введения относятся стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и подходящие для инъекций органические сложные эфиры, такие как этилолеат. К водным носителям относятся вода, спиртовые / водные растворы, эмульсии или суспензии, включая солевой раствор и буферные среды. В композициях и способах согласно настоящему изобретению фармацевтически приемлемые носители включают, помимо прочих, 0,01 - 0,1 М или 0,05 М фосфатного буфера или 0,8 % солевого раствора. К другим распространенным подходящим для парентерального введения основам относятся растворы фосфата натрия, декстроза Рингера, декстроза и хлорид натрия, лактатный раствор Рингера, нелетучие масла и т. п. К подходящим для внутривенного введения основам относятся, помимо прочих, наполнители жидкости и

питательных веществ, наполнители электролитов, например, на основе декстрозы Рингера, и т. п. Также возможно присутствие консервантов и других добавок, например, противомикробных веществ, антиоксидантов, хелатирующих агентов, инертных газов и т. п. В некоторых вариантах осуществления

5 фармацевтические композиции, подходящие для инъекций, включают стерильные водные растворы (в случае водорастворимости) или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. В таких случаях композиция должна

10 быть стерильной и должна быть достаточно жидкой, чтобы ее легко можно было ввести при помощи шприца. Она должна быть устойчивой в условиях производства и хранения, а также защищенной от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. В качестве носителя возможны растворитель или дисперсионная среда, включающие, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.

15 п.), и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть поддерживают, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем сохранения необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ.

[0146] Предотвращения действия микроорганизмов достигают путем

20 применения различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т. п. Также возможно включение в композицию изотонических агентов, например, сахаров, многоатомных спиртов или хлорида натрия. Пролонгированную абсорбцию инъекционных композиций вызывают путем

25 включения в композицию агента, задерживающего абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

[0147] В любом случае стерильные инъекционные растворы

приготавливают путем включения активного соединения (например, антигенсвязывающего белка или его фрагмента) в необходимом количестве в

30 соответствующем растворителе с одним или с комбинацией перечисленных ингредиентов при необходимости, с последующей стерилизацией путем фильтрации. Как правило, дисперсии приготавливают путем включения активного соединения в стерильную основу, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных

выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов способы приготовления, как правило, включают вакуумную сушку и сушку замораживанием, обеспечивающие порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный нужный ингредиент из его предварительно профильтрованного в стерильных условиях раствора. Препараты для инъекций обрабатывают, помещают в контейнеры, такие как ампулы, пакеты, бутылки, шприцы или флаконы, и запечатывают в асептических условиях в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники.

10 [0148] Эффективные дозы композиций согласно настоящему изобретению для лечения вышеописанных состояний разнятся в зависимости от многих разных факторов, включая средства введения, места назначения, физиологического состояния пациента, является ли пациент человеком или животным, других вводимых лекарственных средств, и от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Как правило, пациент является человеком, однако лечению поддаются и отличные от человека млекопитающие, включая трансгенных млекопитающих. Лечебные дозы титруют с применением привычных способов, известных специалистам в данной области техники, для оптимизации безопасности и эффективности.

20 [0149] Как обсуждалось выше, антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению, их иммунореактивные фрагменты или рекомбинанты вводят в фармацевтически эффективном количестве для *in vivo* лечения нарушений у млекопитающих. В этом отношении следует отметить, что раскрываемые антигенсвязывающие белки рецептируют таким образом, чтобы 25 облегчать введение и способствовать стабилизации активного вещества.

[0150] Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением, так правило, включают фармацевтически приемлемый нетоксичный стерильный носитель, такой как физиологический солевой раствор, нетоксичные буферы, консерванты и т. п. С точки зрения данной заявки 30 считается, что фармацевтически эффективное количество модифицированных антигенсвязывающих белков, их иммунореактивных фрагментов или рекомбинантов, конъюгированных или неконъюгированных с терапевтическим агентом, означает количество, достаточное для достижения эффективного связывания с антигеном и достижения благоприятного эффекта, например, для

облегчения симптомов заболевания или нарушения или для обнаружения вещества или клетки. В случае опухолевых клеток модифицированный связывающий полипептид, как правило, способен взаимодействовать с выбранными иммунореактивными антигенами на опухолевых или иммунореактивных клетках и  
5 обеспечивают увеличение гибели этих клеток. Разумеется, фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут вводиться одной или несколькими дозами для обеспечения фармацевтически эффективного количества модифицированного связывающего полипептида.

[0151] В рамках объема настоящего изобретения антигенсвязывающие  
10 белки согласно изобретению вводят человеку или другому животному в соответствии с вышеупомянутыми способами лечения в количестве, достаточном для создания терапевтического или профилактического эффекта. Антигенсвязывающие белки согласно изобретению вводят такому человеку или  
15 другому животному в традиционной дозированной форме, приготовленной путем комбинирования антитела согласно изобретению с традиционным фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем в соответствии с известными технологиями. Специалистам в данной области техники станет  
20 понятно, что форма и характер фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя зависят от количества активного ингредиента, в комбинации с которым он предусмотрен, от пути введения и других общеизвестных переменных. Специалистам в данной области техники также станет понятно, что особенно эффективным может оказаться коктейль, включающий один или  
несколько видов связывающих полипептидов, раскрываемых в данном описании.

[0152] Биологическую активность указанных авторами фармацевтических  
25 композиций определяют, например, путем анализов ингибирования комплемента, неограничивающим примером которых являются иммуноферментные анализы для определения активности функционального классического, лектинового и альтернативного пути активации комплемента в человеческой сыворотке. В некоторых вариантах осуществления ингибирующую  
30 активность указанных авторами фармацевтических композиций оценивают с применением системы Wieslab® Complement system Screen (Svar Life Science AB, Мальме, Швеция).

[0153] Функциональные анализы для исследования способности антител согласно изобретению к ингибированию путей активации комплемента

выполняют с использованием очищенных компонентов комплемента, из которых восстанавливают ферментные комплексы на поверхности эритроцитов или искусственных матриц, как описано в публикации Okroj et al. PLoS One.; 2012; 7 (10): e47245.

5 [0154] Стандартное 50 % титрование гемолитического комплемента (CH50) также является широко применяемым способом оценки способности соединений к ингибированию функциональной активности классического пути активации комплемента, как описано в публикации Jaskowski et al. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology; 1999; 6 (1): 137 - 9.

10 [0155] В некоторых вариантах осуществления активность путей активации комплемента КП, ЛП и АП определяют путем измерения уровня гемолиза эритроцитов в присутствии антигенсвязывающего белка в соответствии с изобретением по сравнению с уровнем гемолиза эритроцитов в отсутствие антигенсвязывающего белка в соответствии с изобретением. В некоторых вариантах осуществления используют сенсibilизированные антителом эритроциты овцы для измерения комплементзависимого гемолиза, опосредованного классическим путем. В некоторых вариантах осуществления используют сенсibilизированные антителом эритроциты кролика для измерения комплементзависимого гемолиза, опосредованного альтернативным путем, как описано в публикации Tomlinson et al. J Immunol. 1997; 159 (11): 5606 - 5609.

20 [0156] В некоторых вариантах осуществления активность путей активации комплемента КП, ЛП и АП определяют путем измерения образования мембраноатакующего комплекса (МАК) в присутствии антигенсвязывающего белка в соответствии с изобретением по сравнению с образованием МАК в отсутствие антигенсвязывающего белка в соответствии с изобретением. Анализ МАК для опосредованной IgM активации классического пути активации комплемента в человеческой сыворотке ведет к откладыванию МАК на покрытых IgM планшетах ELISA. Образование МАК обнаруживают при помощи меченого щелочной фосфатазой антитела к C5b-9. В присутствии антигенсвязывающего белка в соответствии с изобретением сигнал ELISA ослабляется в зависимости от дозы. С целью испытания альтернативного пути применяют анализ МАК для опосредованной LPS активации альтернативного пути активации комплемента в человеческой сыворотке для откладывания МАК на покрытых LPS планшетах ELISA. Соответствующий анализ МАК включает,

помимо прочего, ELISA-анализ мембраноатакующего комплекса комплемента (SC5b-9) от Pacific Biomarkers.

[0157] “Эффективность” или “*in vivo* эффективность” в контексте данного описания означает ответ на терапию с применением фармацевтической композиции согласно изобретению с применением например, стандартизированных критериев ответа, таких как стандартные офтальмологические критерии ответа. Успех или *in vivo* эффективность терапии с применением фармацевтической композиции согласно изобретению означает действительность композиции в отношении предусмотренной цели, т. е., способность композиции к вызыванию желаемого эффекта, т. е., ингибирования пути активации комплемента в глазу. *In vivo* эффективность наблюдают общепринятыми стандартными способами, применяемыми при различных офтальмологических заболеваниях. Способы наблюдения включают, помимо прочего, тест с сеткой Амслера, офтальмоскопию, микроскопию глазного дна, компьютерную томографию глаза и оптическую когерентную томографию. Кроме того, возможно применение различных зависящих от конкретного заболевания параметров клинической химии и других общепринятых стандартных способов.

#### Инженерия и оптимизация антитела

[0158] Антигенсвязывающие белки согласно изобретению поддаются инженерии или оптимизации. В контексте данного описания термины “оптимизированный” или “оптимизация” относятся к изменению антигенсвязывающего белка для улучшения одного или нескольких функциональных свойств. Изменение включает, помимо прочего, делеции, замещения, добавления и/или модификации одной или нескольких аминокислот в пределах антигенсвязывающего белка.

[0159] Применяемый в контексте данного описания термин “функциональное свойство” означает свойство антигенсвязывающего белка, улучшение которого (например, относительно традиционного антигенсвязывающего белка) с точки зрения специалиста в данной области техники является желательным и/или предпочтительным, например, с целью улучшения технологических свойств или терапевтической эффективности антигенсвязывающего белка. В одном варианте осуществления функциональным свойством является устойчивость (например, термическая устойчивость). В

другом варианте осуществления функциональным свойством является растворимость (например, в клеточных условиях). В еще одном варианте осуществления функциональным свойством является агрегационное поведение. В еще одном варианте осуществления функциональным свойством является экспрессия белка (например, в прокариотной клетке). В еще одном варианте осуществления функциональным свойством является рефолдинг после солюбилизации тельца включения в производственном процессе. В некоторых вариантах осуществления функциональное свойство не связано с улучшением аффинности связывания антигена. В другом варианте осуществления улучшение одного или нескольких функциональных свойств не имеет существенного влияния на аффинность связывания антигенсвязывающего белка.

[0160] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок в соответствии с изобретением представляет собой scFv и поддается оптимизации путем идентификации предпочтительных аминокислотных остатков, подлежащих замещению, удалению и/или добавлению в нужных аминокислотных позициях (например, в аминокислотных позициях, идентифицируемых путем сравнения базы данных последовательностей scFv, обладающих по меньшей мере одним нужным свойством, например, отобранным путем анализа контроля качества (QC), с базой данных последовательностей зрелых антител, например, базой данных Кэбата) в антигенсвязывающем белке. Таким образом, изобретение также обеспечивает способы “обогащения / исключения” для отбора конкретного аминокислотного остатка. В еще одном варианте изобретение обеспечивает способы инженерии антигенсвязывающих белков (например, scFvs) путем мутации конкретных каркасных аминокислотных позиций, идентифицированных с применением описанного авторами подхода “функционального консенсуса”. В некоторых вариантах осуществления каркасные аминокислотные позиции подвергают мутации путем замещения существующего аминокислотного остатка остатком, который проявил себя как “обогащенный” остаток при применении способов анализа “обогащения/исключения”, описываемых авторами. В одном аспекте изобретение обеспечивает способ идентификации аминокислотной позиции для мутации в одноцепочечном антителе (scFv), scFv, имеющем аминокислотные последовательности VH и VL, причем способ включает: а) включение аминокислотных последовательностей VH, VL или VH и VL scFv в базу данных,

которая включает разнообразные аминокислотные последовательности VH, VL или VH и VL антитела, таким образом, чтобы сопоставить аминокислотные последовательности VH, VL или VH и VL scFv с аминокислотными последовательностями VH, VL или VH и VL антитела из базы данных; б) сравнение аминокислотной позиции в пределах аминокислотной последовательности VH или VL scFv с соответствующей позицией в пределах аминокислотные последовательности VH или VL антитела из базы данных; в) определение, занята ли аминокислотная позиция в пределах аминокислотной последовательности VH или VL scFv аминокислотным остатком, который является консервативным в соответствующей позиции в пределах аминокислотных последовательностей VH или VL антитела из базы данных; и г) идентификацию аминокислотной позиции в пределах аминокислотной последовательности VH или VL scFv как аминокислотной позиции для мутации, если аминокислотная позиция занята аминокислотным остатком, который не является консервативным в соответствующей позиции в пределах аминокислотных последовательностей VH или VL антитела их базы данных. Оптимизация ScFV подробнее описана в источниках WO2008110348, WO2009000099, WO2009000098 и WO2009155725, которые включены в данное описание путем ссылки.

#### 20 Гуманизация:

[0161] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению подвергают гуманизации. Применяемый в контексте данного описания термин “гуманизованное” означает не принадлежащее человеку донорное, которое было модифицировано для повышения его подобия антителам, продуцируемым в естественных условиях в организме человека. Применяемый в контексте данного описания термин “гуманизация” означает процесс гуманизирования не принадлежащего человеку донорного антитела. Гуманизации достигают путем прививания CDR не принадлежащих человеку донорных антител (например, CDR антител кролика или ламы) к акцепторным каркасным участкам человеческого или гуманизованного антитела, таким как растворимые и стабильные каркасные участки человеческого антитела легкой цепи и/или тяжелой цепи. Общий способ прививания CDR к человеческим акцепторным каркасам описан авторами Winter в Патенте США № 5,225,539 и Queen et al. в документе WO199007861, которые

включены в данное описание путем ссылки. Соответствующие акцепторные каркасные участки могут демонстрировать превосходные функциональные свойства, такие как улучшенная растворимость и стабильность. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению являются антителами кролика. CDR вышеупомянутых антител кролика прививают к универсальному акцепторному каркасному участку, такому как каркасные участки, описываемые в источнике WO2009155726, включенном в данное описание путем ссылки.

[0162] В некоторых вариантах осуществления человеческие каркасы для гуманизации/стабилизации не принадлежащих человеку антител или стабилизации человеческих антител связаны с заменой к соединительного пептида в к переменном легком домене на  $\lambda$  соединительный пептид с образованием в результате к- $\lambda$  химерного переменного легкого домена с улучшенной стабильностью белка и сниженной склонностью к агрегации. Они также связаны с мутацией к консенсусного остатка в позиции АНо101 и заменой  $\lambda$  консенсусного остатка для поддержки упаковки  $\lambda$  соединительного пептида в к- $\lambda$  химерный переменный легкий домен для дополнительного улучшения стабильности белка и дополнительного снижения склонности к агрегации. Дополнительные детали, касающиеся этих человеческих каркасных участков описаны в источниках WO2014206561 и WO2019057787, включенных в данное описание путем ссылки.

#### Способы лечения опосредованных комплементом С3 заболеваний и нарушений

[0163] Обеспечиваются способы лечения опосредованных комплементом С3 заболеваний и нарушений с применением описанных авторами антигенсвязывающих белков у субъекта, страдающего от опосредованного комплементом С3 заболевания или нарушения.

[0164] В некоторых вариантах осуществления опосредованное комплементом С3 заболевание или нарушение выбрано из группы, к которой относятся возрастная макулярная дегенерация (ВМД), географическая атрофия (ГА), неоваскулярная глаукома, диабетическая ретинопатия, синдром Терри, ретролентальная фиброплазия, аутоиммунный увеит, хориоретинит, ретинит, ревматоидный артрит, псориаз и атеросклероз. В некоторых вариантах осуществления С3-опосредованное заболевание является формой ВМД. ВМД,

как правило, разделяют на два главных класса: сухую ВМД и влажную ВМД. Сухая ВМД, также известная как неэкссудативная ВМД, характеризуется наличием друз (желтых отложений) в области желтого пятна. Влажная ВМД, также известная как экссудативная ВМД или неоваскулярная ВМД, характеризуется ростом аномальных кровеносных сосудов из сосудистой оболочки под желтым пятно. Этот процесс также называется неоваскуляризацией сосудистой оболочки, и из новых кровеносных сосудов случается утечка жидкости, такой как кровь, в сетчатку и вокруг нее. Географическая атрофия, также известная как атрофическая ВМД или запущенная сухая ВМД, представляет собой запущенную форму ВМД, способную приводить к прогрессирующей и необратимой потере клеток сетчатки.

[0165] Лечение офтальмологических нарушений, таких как вышеописанная ВМД, особенно проблематично. Как было указано выше, доставка терапевтических агентов в глаз ограничена из-за нескольких барьеров, включая, помимо прочих, гематоретинальные барьеры, такие как ПЭС. Способность проникать через ПЭС и попадать в сосудистую оболочку глаза должна повысить терапевтический потенциал лекарственных средств. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению способны проникать через ПЭС и оболочку Бруха области сосудистой оболочки глаза, таким образом, нацеливаясь на комплемент С3 в области сосудистой оболочки. Способность антигенсвязывающих белков согласно изобретению проникать через ПЭС и оболочку Бруха улучшает их терапевтический потенциал в лечении опосредованных комплементом С3 заболеваний или нарушений. Антигенсвязывающие белки согласно изобретению способны проникать через ПЭС и оболочку Бруха частично благодаря их размеру, который достаточно мал для содействия проникновению. В некоторых вариантах осуществления размер антигенсвязывающих белков согласно изобретению измеряют по молекулярной массе. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению имеют молекулярную массу, меньшую, чем приблизительно 60 кДа. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению имеют молекулярную массу от приблизительно 20 кДа до приблизительно 30 кДа или от приблизительно 10 кДа до приблизительно 20 кДа. В некоторых

вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению имеют молекулярную массу приблизительно 25 кДа. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению имеют молекулярную массу приблизительно 15 кДа. В некоторых вариантах осуществления размер антигенсвязывающих белков согласно изобретению измеряют по их гидродинамическому радиусу. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению имеют гидродинамический радиус, меньший или равный приблизительно 3,0 нм. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению имеют гидродинамический радиус, меньший или равный приблизительно 2,5 нм. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению имеют гидродинамический радиус, меньший или равный приблизительно 2,0 нм.

[0166] В одном аспекте изобретение обеспечивает способ ингибирования классического пути (КП), лектинового пути (ЛП) и альтернативного пути (АП) активации комплемента, причем способ включает приведение комплемента С3 в контакт с антигенсвязывающим белком или его фрагментом, который связывает эпитоп на комплементе С3. Способность антигенсвязывающих белков согласно изобретению к ингибированию всех трех путей активации комплемента также улучшает их терапевтический потенциал в лечении опосредованных комплементом С3 заболеваний или нарушений. Без ограничения какой-либо теорией следует отметить, что ингибирование всех трех путей активации комплемента способно улучшить терапевтический потенциал антигенсвязывающих белков согласно изобретению путем предотвращения компенсации способствующими заболеванию эффектами одного активного пути других инактивированных путей.

[0167] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен в приблизительно эквивалентной степени ингибировать активность путей активации комплемента КП, ЛП и АП. В качестве неограничивающего примера антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен ингибировать активность пути КП по меньшей мере на 80 %, способен ингибировать активность ЛП по меньшей мере на 80 % и способен ингибировать активность АП по меньшей мере на 80 %. В некоторых вариантах осуществления ингибирование активности путей активации комплемента КП,

ЛП и АП составляет по меньшей мере приблизительно 80 %, по меньшей мере приблизительно 85 %, по меньшей мере приблизительно 90 % или по меньшей мере приблизительно 95 %.

[0168] В другом аспекте изобретение обеспечивает способ ингибирования активности локализованного в сосудистой оболочке комплемента С3 путем внутриглазного введения антигенсвязывающего белка или его фрагмента, который связывает эпитоп на комплементе С3. Активированный путь активации комплемента в области сосудистой оболочки глаза способствует опосредованным комплементом С3 заболеваниям или нарушениям. Таким образом, цель изобретения состоит в обеспечении антигенсвязывающих белков, способных проникать и диффундировать в область сосудистой оболочки нацеливаться на комплемент С3 и С3b. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению ингибируют активность С3-конвертазы в области сосудистой оболочки глаза. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки согласно изобретению ингибируют петлю амплификации С3-конвертазы в области сосудистой оболочки глаза.

#### Медицинское применение

[0169] Изобретение также касается описанного авторами антигенсвязывающего белка или его фрагмента для применения согласно способу лечения опосредованного комплементом С3 заболевания или нарушения у субъекта. Применимы все технические особенности, раскрываемые в данном описании, касающемся антигенсвязывающих белков или их фрагментов.

#### Комплекты

[0170] Изобретение также охватывает комплекты, включающие по меньшей мере один антигенсвязывающий белок или его фрагмент, как описано авторами. В одном варианте осуществления комплект включает композицию, содержащую эффективное количество вышеупомянутого антигенсвязывающего белка или его фрагмента в стандартной лекарственной форме. Такой комплект включает стерильный контейнер, содержащий композицию; неограничивающими примерами таких контейнеров являются, помимо прочего, флаконы, ампулы, бутылки, пробирки, шприцы, блистерные упаковки. В некоторых вариантах осуществления композиция является фармацевтической композицией, и контейнеры выполнены из материала, подходящего для хранения медикаментов. В одном варианте осуществления комплект включает в первом

контейнере антигенсвязывающий белок или его фрагмент в лиофилизированной форме и второй контейнер с разбавителем (например, стерильной водой) для восстановления влагосодержания или разведения антигенсвязывающего белка или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый разбавитель является фармацевтически приемлемым разбавителем.

[0171] Как правило, комплект также включает отдельные листок, памятку или карточку, поставляемые в контейнере или прилагаемые к нему, с инструкциями по применению. Если комплект предусмотрен для фармацевтического применения, в возможных вариантах он также включает один или несколько из следующих компонентов: информацию по введению композиции субъекту с опосредованным компонентом СЗ заболеванием или нарушением и схему применения, описание терапевтического агента, особые указания, предупреждения, показания, противопоказания, информацию о передозировке и/или побочных реакциях.

#### 15 Диагностическое применение и/или обнаружение

[0172] Антигенсвязывающий белок или его фрагмент согласно настоящему изобретению также применим с целью обнаружения или диагностики *in vivo* и/или *in vitro*. Например, специалистам в данной области техники известен широкий выбор иммуноанализов с использованием антигенсвязывающих белков для обнаружения экспрессии в специфических клетках или тканях. Для такого применения описываемый авторами антигенсвязывающий белок или его фрагмент бывает меченым или немеченым. В качестве неограничивающего примера немеченый антигенсвязывающий белок может быть использован и обнаружен вторичным антителом, распознающим эпитоп на описанном авторами антигенсвязывающем белке. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент конъюгирован с одним или несколькими веществами, поддающимися распознаванию детекторным(и) веществом(ами), например, антигенсвязывающий белок или его фрагмент, конъюгированных с биотином, который поддается обнаружению стрептавидином. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент применяют для обнаружения наличия СЗ и/или СЗb в образце. В некоторых вариантах осуществления образец является биологическим образцом. Применяемый в контексте данного описания термин "обнаружение" охватывает количественное и/или качественное обнаружение. В некоторых

вариантах осуществления биологический образец включает клетку или ткань, такую как ткань сетчатки, взятую у человека.

[0173] В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение биологического образца в контакт с по меньшей мере одним антигенсвязывающим белком или его фрагментом согласно настоящему изобретению; обеспечение возможности образования комплексов между C3 (в случае присутствия) и антигенсвязывающим белком или его фрагментом в образце; а затем обнаружение вышеупомянутого антигенсвязывающего белка или его фрагмента. В предпочтительных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен связывать комплемент C3 и C3b.

[0174] В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент обнаруживают через обнаружимый сигнал. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент обнаруживают при помощи ELISA, иммуноцитохимии (ИЦХ), иммуногистохимии (ИГХ), вестерн-блоттинга и/или проточной цитометрии.

[0175] В возможных вариантах биологический образец представляет собой образец ткани, такой как ткань сетчатки. В возможных вариантах образец ткани является зафиксированным образцом ткани, таким как зафиксированный в формалине и залитый парафином образец ткани.

[0176] В одном варианте осуществления такой способ применяют для отбора пациентов, т. е., для определения пригодности субъекта для терапии с применением антигенсвязывающих белков или их фрагментов, как описано авторами.

[0177] Для специалистов в данной области техники станет очевидной возможность других подходящих модификаций и адаптаций описываемых авторами способов с применением подходящих эквивалентов без отклонения от объема раскрываемых авторами вариантов осуществления. После подробного описания определенных вариантов осуществления, для более ясного их понимания ниже представлены примеры, включенные лишь для пояснения, но не предполагающие ограничения объема изобретения.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1 – Генерирование и характеристика библиотеки антител против С3**

[0178] Для генерирования антител, ингибирующих каскад комплемента более эффективно, чем это возможно в случае частичных ингибиторов комплемента, была высказана гипотеза, что широкий выбор антител против С3 с разным распознаванием эпитопа увеличивает вероятность выделения антител с нужной функцией. Для этого строили большие фаговые библиотеки антител с использованием геномной информации, кодирующей переменные домены антитела, взятые из В-клеток животных, иммунизированных С3.

[0179] Для генерирования многочисленных антител, способных распознавать разные эпитопы на С3, 3 новозеландских белых кролика и 2 ламы иммунизировали нативным человеческим белком С3, очищенным от сыворотки (**Фигура 2**). Каждое животное получало 4 инъекции белка С3 в разные моменты времени с полным или неполным адъювантом Фройнда (**Фигура 3А**). Иммунный ответ каждого животного тестировали с применением ELISA для количественного определения антител против С3, присутствующих в образцах сыворотки иммунизированных животных. Титры антитела в сыворотке указывали на превосходные показатели иммунного ответа (**Фигура 3В**).

[0180] Библиотеки кДНК scFv антител создавали из РНК, извлеченной из выделенных ВМС и лимфоцитов кроликов путем ПЦР-амплификации. Кодированные последовательности для переменного легкого и тяжелого домена амплифицировали отдельно и связывали с применением серии этапов перекрывающейся полимеразной цепной реакции (ПЦР) для получения конечных продуктов scFv.

[0181] У лам производили большой забор крови, из которой выделяли РНК, которую транскрибировали в кДНК с использованием комплекта обратной транскриптазы. КДНК очищали, фрагменты тяжелой цепи амплифицировали с использованием отжига праймеров в области лидерной последовательности и в области СН2.

[0182] Последовательности амплифицированных ДНК, кодирующие scFv кроликов и VHH лам, расщепляли, используя соответствующие рестрикционные ферменты, а затем лигировали в фагмидные векторы. Фагмидные векторы трансформировали в электрокомпетентные клетки TG1, которые хорошо

подходят для создания фаг-дисплейных библиотек антител. В результате этих процессов были получены четыре библиотеки антител с размерами более  $10^8$  клонов, и процент вставки приближался к 100 % (**Фигура 4А** и **Фигура 4В**).

**Пример 2 – Отбор антитела против С3, ингибирующего все три пути**

**активации комплемента**

[0183] С3 представляет собой большой белок, состоящий из 13 разных доменов, с размером молекулы 185 килодальтон. Во время активации комплемента С3 подвергают протеолитическому расщеплению и структурным модификациям в разных местах. Производные от С3 фрагменты обеспечивают различные эффекторные функции и образуют конвертазы, которые активизируют петли амплификации путей активации комплемента. Фермент С3-конвертаза способен расщеплять множество молекул С3 до С3b для генерирования большего количества С3-конвертазы в мощной петле амплификации, что в результате ведет к полной активации системы комплемента. Описываемый авторами отбор применяли для идентификации антител, связывающих разные эпитопы на С3 и С3b и эффективно блокируют все три пути активации комплемента (классический, лектиновый и альтернативный).

[0184] Для отбора антител против С3 с высокой аффинностью антитела scFvs и VHH, представленные на фагах, продуцировали и подвергали нескольким циклам биопэннинга (отбора) на нативном человеческом С3, очищенном от сыворотки. Строгость отбора с каждым циклом увеличивали либо путем уменьшения концентрации белка С3, применяемого в биопэннинге, либо путем увеличения строгости промывок. Приблизительно 380 моноклональных фагов было выбрано и отобрано на их способность к связыванию С3 в анализах ELISA (**Фигура 5**).

[0185] На основе данных ELISA и ДНК-фингерпринта 41 клон фагов отобрали для секвенирования и рекомбинантно продуцировали как белки антител и оценивали на их способность к связыванию С3 и С3b человека и для дальнейшей характеристики (**Фигура 5**).

[0186] Для идентификации антител, блокирующих все 3 пути активации комплемента, антитела отбирали с применением ферментного иммуноанализа для качественного определения функциональных классического, лектинового и альтернативного путей активации комплемента в человеческой сыворотке с применением системы Wieslab® Complement system Screen (Svar Life Science AB,

Мальме, Швеция). Количество генерируемого неоантигена C5b-C9 пропорционально функциональной активности путей активации комплемента. Как показано на **Фигура 6**, пять антител, M0251, M0228, M0122, M0123 и M0124, были способны ингибировать все три пути активации комплемента при фиксированной концентрации 2 мкМ по меньшей мере на 90 % в человеческой сыворотке (Quidel).

**Пример 3 – Характеризация антител против C3: M0251, M0228, M0122, M0123 и M0124**

[0187] M0251, M0228, M0122, M0123 и M0124 испытывали попарным комбинаторным способом для идентификации тех, которые нацелены на один и тот же участок (эпитоп) на C3. В общих чертах, одно антитело метили путем биотинилирования и инкубировали вместе с клонами другого антитела в ELISA-анализе связывания C3. Антитела против C3, которые конкурировали за один и тот же участок связывания, рассматривали как имеющие подобные эпитопы и, таким образом, имеющие подобные функции. Эта информация позволяет уменьшить количество потенциальных кандидатных антител при сохранении разнообразия эпитопов. Из пяти антител, ингибирующих все три пути активации комплемента, M0251, M0228 и M0123 рассматривали как имеющие один и тот же эпитоп на C3 (**Фигура 7D**). Предполагалось, что ингибирующие антитела связываются с тремя различными эпитопами на C3 (**Фигуры 7A - 7D**).

[0188] Антитела, идентифицированные как способные ингибировать все три пути активации комплемента, оценивали на их способность к связыванию с C3 яванского макака в анализе ELISA. В общих чертах, 96-луночные планшеты ELISA покрывали поликлональной антисывороткой козы, считающейся перекрестно реагирующей с C3 яванского макака, с последующей вторичной ассоциацией со специально приготовленным препаратом сыворотки яванского макака (BioIVT, NB-151558). Серийные разведения молекул антител добавляли в планшет ELISA и антитела, связывающиеся с C3 яванского макака, обнаруживали при помощи меченого HRP кроличьего антитела против человеческого Карра (Abcam, ab202549) или меченого HRP мышинового антитела против гистидиновой метки (R&D Systems, MAB050H). M0122, M0124 и M0251 демонстрируют дозозависимое связывание с C3 яванского макака. Интересно, что хотя M0251, M0228 и M0123 конкурируют за один и тот же эпитоп на C3

человека, только M0251 продемонстрировало активность связывания с C3 яванского макака (**Фигуры 15А и 15В**).

[0189] Систему Wieslab Complement system Screen применяли для оценки способности антител против C3 ингибировать все пути активации комплемента в сыворотке яванского макака. Антитела против C3 добавляли к специально подготовленному препарату сыворотки яванского макака. **Фигура 14А** показывает сильное ингибирование всех трех путей активации комплемента со стороны M0122, M0124 и M0251 в фиксированной концентрации 2 мкМ, что указывало на то, что M0122, M0124 и M0251 являются мощными ингибиторами комплемент-опосредованного образования МАК в сыворотке яванского макака. M0228 не продемонстрировало ингибирующей активности в отношении пути активации комплемента в сыворотке яванского макака, подтверждая отсутствие связывающей активности, которая наблюдается у этого антитела к C3 яванского макака (**Фигура 14В**). Дозозависимое ингибирование классического и альтернативного путей в сыворотке яванского макака также оценивали для M0122, M0124 и M0251, применяя соответствующие комплекты системы комплемента Wieslab (**Фигуры 14В и 14С**).

[0190] M0122, M0124 и M0228 оценивали на их способность к связыванию человеческих C3 и C3b в ELISA-анализе прямого связывания (**Фигура 8А и Фигура 8В**). В общих чертах, 96-луночные планшеты ELISA покрывали очищенными нативными человеческими C3 или C3b (Complement Technology, A113 и A114). Серийные разведения молекул антител добавляли в планшет и обнаруживали при помощи меченого HRP кроличьего антитела против человеческого Каппа (Abcam, ab202549) или меченого HRP кроличьего антитела против гистидиновой метки (Abcam, ab1187). M0122, M0124 и M0228 демонстрируют высокоаффинное связывание с человеческими C3 и C3b. Кинетику связывания M0122, M0124 и M0228 с человеческим C3 дополнительно анализировали путем биослойной интерферометрии, демонстрирующей аффинность в низшем пиколярном диапазоне (**Фигура 10**).

[0191] Дозозависимое ингибирование альтернативного и классического путей в человеческой сыворотке оценивали для M0122, M0124 и M0228 применяя соответствующие комплекты системы комплемента Wieslab. Антитела против C3 M0122, M0124 и M0228 демонстрируют сильное ингибирование альтернативного и классического путей в человеческой сыворотке (**Фигура 9А и**

**Фигура 9В).** Антитела против С3 М0122, М0123 и М0124 также оценивали на их способность к ингибированию лектинового пути в дозозависимом режиме.

**Фигура 16** показывает эффективное ингибирование лектинового пути в человеческой сыворотке. В комбинации эти результаты дополнительно подтверждают эффективное ингибирование всех трех путей активация комплемента антителами согласно изобретению.

**Пример 4 – Антитела против С3 с большей вероятностью проникают через оболочку Бруха по сравнению с APL-2**

[0192] В настоящее время известно, что система комплемента играет роль в патогенезе географической атрофии. Однако до сих пор не выяснено, каким образом активность комплемента изолирована в пределах глаза, и зависит ли эффективность терапии против ГА от доставки терапевтических средств в надлежащие анатомические центры в пределах глаза. Авторы изобретения высказывают гипотезу, что улучшение проникновения в связанные с заболеванием ткани сетчатки (т. е., ПЭС, оболочку Бруха и сосудистую оболочку) может быть необходимым для достижения большего уменьшения роста повреждения при ГА. Внутреннюю часть сосудистой оболочка называют хориокапилляром, который содержит капилляры, разделенные слоем внеклеточной мембраны, называемой оболочкой Бруха (BrM) (**Фигура 11**).

[0193] Оболочка Бруха является выборочно проницаемой для антител и биопрепаратов. Как сообщается в публикации Clark et al. (Front. Immunol. 2017. 8: 1 - 10), белки пути активации комплемента не способны проходить через оболочку Бруха, за исключением FHL-1, фактора D и C5a. В целом антитела и биопрепараты с большими гидродинамическими радиусами с меньшей вероятностью проходят через оболочку Бруха. Как показано ниже в Таблице 3, за исключением APL-2 и CDR2 (scFv против С3 согласно изобретению), перечисленные молекулы с гидродинамическими радиусами свыше 3,00 не способны пройти через оболочку Бруха, за исключением FHL-1; с другой стороны, все перечисленные молекулы с гидродинамическими радиусами свыше 3,00 способны пройти через оболочку Бруха, за исключением С3а.

**Таблица 3: Факторы размера списка биопрепаратов**

Белок	Гидродинамический радиус (нм)	м/м (кДа)	Диффузия (ОБ >70 лет)
APL-2*	~7-8	43 (лин. ПЭГ)	Н/и
IgG	~6	150	Нет
Фактор H	5,56	155	Нет
C3	4,84	180	Нет
FHL-1	4,40	49	Да
Фактор B	3,22	83	Нет
Фактор I	3,07	65	Нет
Fab-фрагмент	2,91	50	Да
<b>CDR2*</b>	<b>2,5</b>	<b>26</b>	<b>Н/и</b>
Фактор D	2,08	24	Да
C3a	1,56	9	Нет
C5a	1,63	8,3	Да

[0194] Кроме того, авторы публикации Pitkänen et al. (Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005; 46 (2): 641 - 6) изучали проницаемость свежих образцов ПЭС-сосудистой оболочки глаз крупного рогатого скота для карбоксифлуоресцеина, меченных флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) декстранов с молекулярной массой от 4 до 80 кДа. Нами был построен график зависимости проницаемости от размера молекул (**Фигура 12**, черные точки). Нами также были выведены значения проницаемости scFv, люцентиса, эйлеа и APL2 на основе гидродинамических радиусов с использованием исследования, выполненного Hirvonen et al. (Pharm Res. 2016; 33 (8): 2025 - 32), и использована зависимость проницаемости от молекулярной массы на том же графике (**Фигура 12**, цветные точки). Тенденция показывает, что чем больше молекулярная масса, тем хуже проникновение через оболочку Бруха.

[0195] Нами было спрогнозировано, что с высокой вероятностью антитела против C3 согласно изобретению в форме фрагментов антител, такие как, помимо прочих, формат scFv или VHH, с гидродинамическими радиусами приблизительно 2,5 нм и меньше, способны лучше проникать через оболочку Бруха, чем APL-2 (два направленных против C3 циклических пептида APL-1, связанных с линейным ПЭГ, 40 кДа, всего 43 кДа), гидродинамический радиус которого составляет по меньшей мере 7 нм.

[0196] Для испытания этой гипотезы способность молекул против C3 к проникновению через BgM оценивали с использованием обогащенной свиной BgM, закрепленной на камере Уссинга. В общих чертах, обогащенную оболочку Бруха выделяли из свиного глаза и закрепляли в диффузионной камере Уссинга

(Multi Channel Systems MCS GmbH, Cat. No. 660026). Сразу после закрепления оболочка Бруха диаметром 5 мм была единственным барьером между двумя идентичными компартментами. Обе стороны оболочки Бруха промывали, используя 1 мл PBS в течение по меньшей мере 5 мин при комнатной температуре. Для испытания на утечку 1 мл PBS добавляли в камеру для образцов и утечку во второй компартмент наблюдали в течение 5 мин. Если утечки не наблюдали, что должно было указывать на нарушение целостности мембраны, в камеру для образцов добавляли белки антитела в 1 мл PBS в концентрации 100 мкг/мл и 1 мл PBS добавляли во второй компартмент (камеру для диффузата). Всю камеру Уссинга инкубировали при комнатной температуре в течение 24 ч с осторожным взбалтыванием во избежание генерации градиента диффундирующих белков. Образцы из каждой камеры (15 мкл) анализировали при помощи гель-электрофореза. Готовые 4 – 12 % NuPAGE Bis Tris SDS гели (Thermo Fisher Scientific) пропускали в течение 40 мин при 200 В в восстановительных условиях. Гели окрашивали красителем Instant Blue (Expedeon) в течение 60 мин при комнатной температуре для обнаружения белков антитела или раствором йодида бария для обнаружения ПЭГ (фиксация геля 0,1 М перхлорной кислоты, которую через 15 мин заменяли предварительно смешанным раствором 20 мл 5 %  $BaCl_2$  и 8 мл 0,1 М йода, который через 10 мин повторно заменяли деионизированной водой каждые 10 мин в течение 1 ч). С целью вычисления процента белка в образце или камерах с диффузатом плотность полосы в окрашенных Instant Blue или окрашенных  $BaI_2$  SDS гелей измеряли с применением программы ImageJ. Среднюю интенсивность этих полос сравнивали с плотностью контрольных полос, которая представляет 100 % загруженного белка (т. е., 15 мкл при 100 мкг/мл). Затем вычисленный процент белка наносили на график  $\pm SD$ . Способность к преодолению свиной BgM сравнивали для производной scFv M0123 (26 кДа) и суррогата APL-2 (один анти-С3 циклический APL-1 пептид, связанный с 40 кДа линейным ПЭГ, всего 42 кДа), которые одновременно инкубировали на препаратах BgM из четырех разных свиных глаз. Значительно большее количество scFv преодолеvalo BgM во всех четырех препаратах мембраны по сравнению с суррогатом APL-2 (**Фигура 13А** и **Фигура 13В**).

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент, который связывает эпитоп на комплементе C3, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен ингибировать пути активации комплемента, включая классический путь (КП), лектиновый путь (ЛП) и альтернативный путь (АП).  
5
2. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по п. 1, способный связывать комплемент C3 и C3b.  
10
3. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по п. 1, способный связывать эпитоп на комплементе C3, причем такое связывание предотвращает образование C3-конвертазы.  
15
4. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 3, способный проникать через оболочку Бруха.  
20
5. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 4, способный конкурировать с одним или несколькими антигенсвязывающими белками, включая M0122, M0123, M0124, M0228 и M0251.  
25
6. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 5, включающий одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, Fv-фрагмент, диатело, малый миметик антитела или однодоменное антитело, такое как, например, sdAb, sdFv, нанотело, V-Nar или VHH.  
30
7. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 6, включающий CDR-H3, имеющий по меньшей мере 80 % подобия с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 21.

8. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 7, включающий переменную тяжелую цепь (VH) и переменную легкую цепь (VL),

5       причем VH включает последовательность CDR-H1, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 1, 4, 7, 13 и 19, последовательность CDR-H2, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 2, 5, 8, 14 и 20, последовательность CDR-H3, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 3, 6, 9, 15 и 21; и

10       причем VL включает последовательность CDR-L1, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 10, 16 и 22, последовательность CDR-L2, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 11, 17 и 23, и последовательность CDR-L3, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 12, 18 и 24.

15       9. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 8, причем VH имеет по меньшей мере 80 % подобия с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 29 и 31, и/или VL имеет по меньшей мере 80 % подобия с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 30 и 32.

20       10. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 9, включающий VH и VL,

25       причем VH включает последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 7, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 8 и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 9; и

причем VL включает последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 10, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 11 и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 12.

30       11. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по п. 10, причем VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и VL включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

12. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 9, включающий VH и VL,

причем VH включает последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 13, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 14 и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 15; и

причем VL включает последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 16, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 17 и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 18.

13. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по п. 12, причем VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и VL включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

14. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 9, включающий VH и VL,

причем VH включает последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 19, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 20 и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 21; и

причем VL включает последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 22, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 23 и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 24.

15. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по п. 14, причем VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и VL включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.

16. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 9, включающий домен VHH,

причем домен VHH включает последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3.

17. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по п. 16, причем домен VHH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

18. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 9, включающий домен VHH,

5 причём домен VHH включает последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 5 и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 6.

19. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по п. 18, причём домен VHH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

10

20. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 19, имеющий связывающую аффинность к C3 и C3b по меньшей мере приблизительно  $10^{-8}$  М.

15 21. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 19, имеющий связывающую аффинность к C3 и C3b от приблизительно  $10^{-9}$  М до приблизительно  $10^{-14}$  М.

20 22. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 19, имеющий связывающую аффинность к C3 и C3b от приблизительно  $10^{-10}$  М до приблизительно  $10^{-12}$  М.

25 23. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 19, имеющий приблизительно эквивалентную связывающую аффинность к C3 и C3b.

24. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 19, причём связывающая аффинность к C3 находится в пределах одного порядка по отношению к связывающей аффинности к C3b.

30

25. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 19, имеющий связывающую аффинность к C3a, iC3b, C4, C4b, C5 и/или C5b приблизительно  $10^{-4}$  М или слабее.

26. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 19, имеющий более слабую связывающую аффинность к С3а, iС3b, С4, С4b, С5 и/или С5b по сравнению со связывающей аффинностью к С3 и С3b.

5

27. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 19, не имеющий связывающей аффинности к С3а, iС3b, С4, С4b, С5 и/или С5b.

10

28. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 27, способный ингибировать активность любого из путей активации комплемента группы, состоящей из КП, ЛП и АП.

15

29. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 28, способный ингибировать активность путей активации комплемента КП, ЛП и АП по меньшей мере приблизительно на 80 %, по меньшей мере приблизительно на 85 %, по меньшей мере приблизительно на 90 % или по меньшей мере приблизительно на 95 %.

20

30. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 29, способный в приблизительно эквивалентной степени ингибировать активность путей активации комплемента КП, ЛП и АП.

25

31. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по п. 30, причем ингибирование активности путей активации комплемента КП, ЛП и АП составляет по меньшей мере приблизительно 80 %, по меньшей мере приблизительно 85 %, по меньшей мере приблизительно 90 % или по меньшей мере приблизительно 95 %.

30

32. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 28 по 31, причем активность путей активации комплемента КП, ЛП и АП определяют путем измерения уровня гемолиза эритроцитов в присутствии антигенсвязывающего белка или его фрагмента по сравнению с уровнем

гемолиза эритроцитов в отсутствие антигенсвязывающего белка или его фрагмента.

5 33. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 28 по 31, причем активность путей активации комплемента КП, ЛП и АП определяют путем измерения образования мембраноатакующего комплекса (МАК) в присутствии антигенсвязывающего белка или его фрагмента по сравнению с образованием МАК в отсутствие антигенсвязывающего белка или его фрагмента.

10

34. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 33, способный ингибировать активность С3-конвертазы по меньшей мере приблизительно на 80 %, по меньшей мере приблизительно на 85 %, по меньшей мере приблизительно на 90 % или по меньшей мере приблизительно на 95 %.

15

35. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 34, способный ингибировать петлю амплификации С3-конвертазы.

20

36. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 35, способный ингибировать активность С3 сосудистой оболочки.

25 37. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 36, имеющий молекулярную массу приблизительно 60 кДа или меньше.

30 38. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 37, имеющий молекулярную массу от приблизительно 20 кДа до приблизительно 30 кДа.

39. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 37, имеющий молекулярную массу от приблизительно 10 кДа до приблизительно 20 кДа.

40. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 37, имеющий молекулярную массу приблизительно 25 кДа.

5 41. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 37, имеющий молекулярную массу приблизительно 15 кДа.

10 42. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 41, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет перекрестную реактивность с С3 яванского макака.

15 43. Применение антигенсвязывающего белка или его фрагмента по одному из пунктов с 1 по 42 в приготовлении фармацевтической композиции для лечения опосредованного комплементом С3 заболевания или нарушения у субъекта.

20 44. Фармацевтическая композиция, включающая антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из предыдущих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель.

45. Фармацевтическая композиция по пп. 43 или 44, имеющая низкую вязкость.

25 46. Фармацевтическая композиция по п. 45, причем вязкость составляет от приблизительно 1 сП до приблизительно 50 сП.

47. Фармацевтическая композиция по п. 45, причем вязкость является меньшей или равняется приблизительно 20 сП.

30 48. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из предыдущих пунктов.

49. Вектор экспрессии, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 48.

50. Клетка-хозяин, включающая вектор экспрессии по п. 49.

5

51. Способ производства антигенсвязывающего белка или его фрагмента по одному из пунктов с 1 по 42, включающий этапы:

(I) культивирования клетки-хозяина по п. 50, в условиях, обеспечивающих возможность экспрессии белка по одному из пунктов с 1 по 42;

10

(II) извлечения белка; и, необязательно,

(III) дальнейшей очистки и/или модифицирования и/или рецептирования белка.

15

52. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 42 для применения согласно способу лечения опосредованного комплекментом С3 заболевания или нарушения у субъекта.

20

53. Способ лечения опосредованного комплекментом С3 заболевания или нарушения у субъекта, включающий введение субъекту, который в этом нуждается, антигенсвязывающего белка или его фрагмента по одному из предыдущих пунктов.

25

54. Способ по п. 53 или антигенсвязывающий белок или его фрагмент для применения по п. 52, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент вводят путем местного, субконъюнктивного, интравитреального, ретробульбарного и/или интракамерального введения.

30

55. Способ по пп. 53 или 54 или антигенсвязывающий белок или его фрагмент для применения по пп. 52 или 54, причем опосредованное комплекментом С3 заболевание или нарушение выбрано из группы, к которой относятся возрастная макулярная дегенерация, географическая атрофия, неоваскулярная глаукома, диабетическая ретинопатия, синдром Терри, ретролентальная фиброплазия, аутоиммунный увеит, хориоретинит, ретинит, ревматоидный артрит, псориаз и атеросклероз.

56. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 42 для применения в согласно способу лечения опосредованного комплементом С3 заболевания или нарушения у субъекта путем ингибирования классического пути (КП), лектинового пути (ЛП) и альтернативного пути (АП) активации комплемента или путем ингибирования активности локализованного в сосудах оболочке комплемента С3.

57. Способ ингибирования классического пути (КП), лектинового пути (ЛП) и альтернативного пути (АП) активации комплемента, причем способ включает приведение комплемента С3 в контакт с антигенсвязывающим белком или его фрагментом, который связывает эпитоп на комплементе С3.

58. Способ ингибирования активности локализованного в сосудах оболочке комплемента С3, причем способ включает внутриглазное введение антигенсвязывающего белка или его фрагмента, который связывает эпитоп на комплементе С3.

59. Способ по пп. 57 или 58, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен связывать комплемент С3 и С3b.

60. Способ по одному из пунктов с 57 по 59, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен связывать эпитоп на комплементе С3, причем такое связывание предотвращает образование С3-конвертазы.

61. Способ по одному из пунктов с 57 по 60, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен конкурировать с одним или несколькими антигенсвязывающими белками, включая M0122, M0123, M0124, M0228 и M0251.

62. Способ по одному из пунктов с 57 по 61, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент включает одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, Fv-фрагмент,

диатело, малый миметик антитела или однодоменное антитело, такое как, например, sdAb, sdFv, нанотело, V-Nag или VHH.

5 63. Способ по одному из пунктов с 57 по 62, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент включает CDR-H3, имеющий по меньшей мере 80 % подобия с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 21.

10 64. Способ по одному из пунктов с 57 по 62, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент включает переменную тяжелую цепь (VH) и переменную легкую цепь (VL),

причем VH включает последовательность CDR-H1, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 1, 4, 7, 13 и 19, последовательность CDR-H2, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 2, 5, 8, 14 и 20, 15 последовательность CDR-H3, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 3, 6, 9, 15 и 21; и

причем VL включает последовательность CDR-L1, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 10, 16 и 22, последовательность CDR-L2, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 11, 17 и 23, и 20 последовательность CDR-L3, выбранную из группы, к которой относятся SEQ ID NO: 12, 18 и 24.

25 65. Способ по п. 64, причем VH имеет по меньшей мере 80 % подобия с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 29 и 31, и/или VL имеет по меньшей мере 80 % подобия с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 30 и 32.

30 66. Способ по одному из пунктов с 57 по 65, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен проникать через оболочку Бруха.

67. Способ по одному из пунктов с 57 по 66, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен ингибировать активность С3 сосудистой оболочки.

68. Способ по одному из пунктов с 57 по 67, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет молекулярную массу приблизительно 60 кДа или меньше.

5

69. Способ по одному из пунктов с 57 по 68, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет молекулярную массу от приблизительно 20 кДа до приблизительно 30 кДа.

10

70. Способ по одному из пунктов с 57 по 69, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет молекулярную массу от приблизительно 10 кДа до приблизительно 20 кДа.

15

71. Способ по одному из пунктов с 57 по 68, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет молекулярную массу приблизительно 25 кДа.

20

72. Способ по одному из пунктов с 57 по 68, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент имеет молекулярную массу приблизительно 15 кДа.

73. Способ обнаружения одного или обоих из С3 и С3b в биологическом образце, включающий этапы:

25

(а) приведения образца в контакт с по меньшей мере одним антигенсвязывающим белком или его фрагментом по одному из пунктов с 1 по 42;

(б) обеспечения возможности образования комплексов между одним или обоими из С3 и С3b и антигенсвязывающим белком или его фрагментом в образце; и

30

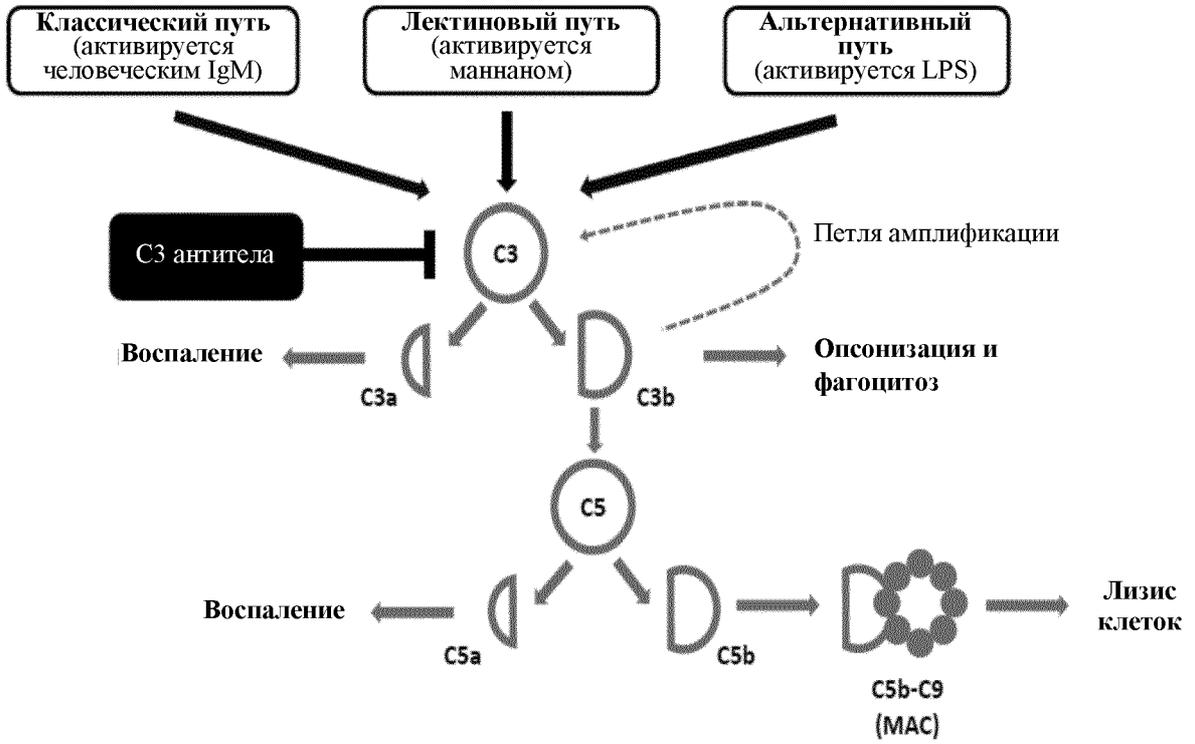
(в) обнаружения вышеупомянутого антигенсвязывающего белка или его фрагмента.

74. Способ по п. 73, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент способен связывать комплемент С3 и С3b.

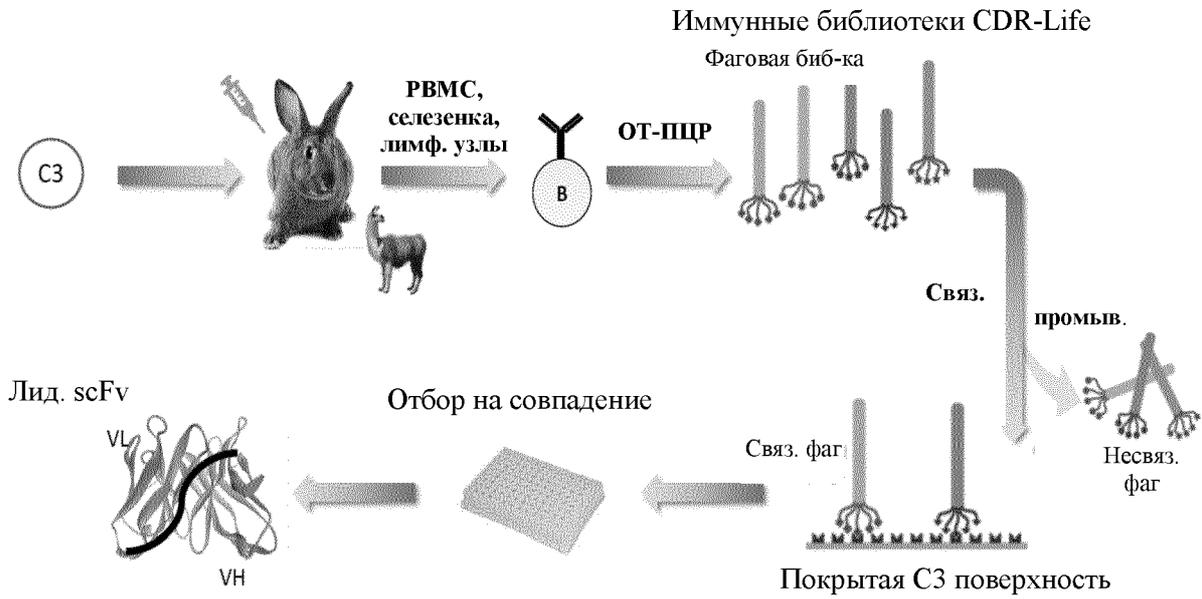
75. Способ по пп. 73 или 74, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент обнаруживают через обнаружимый сигнал.

5 76. Способ по одному из пунктов с 73 по 75, причем биологический образец представляет собой образец ткани, например, ткани сетчатки.

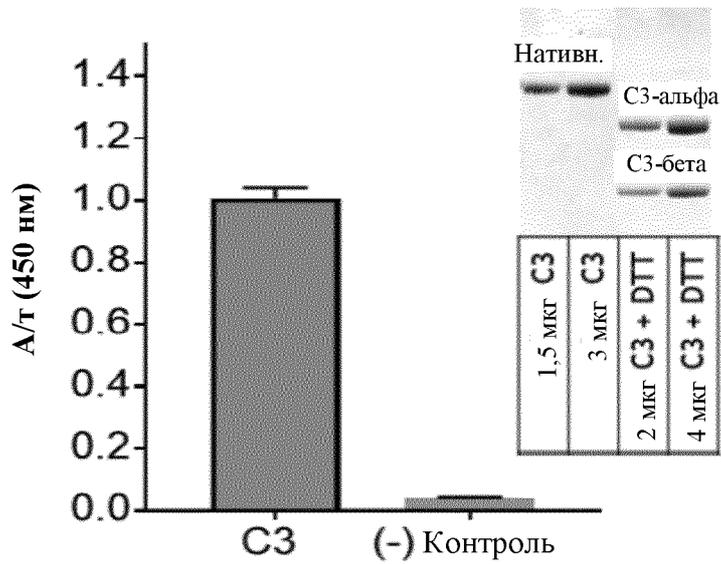
10 77. Комплект для обнаружения СЗ, включающий антигенсвязывающий белок или его фрагмент по одному из пунктов с 1 по 42, и инструкции по применению.



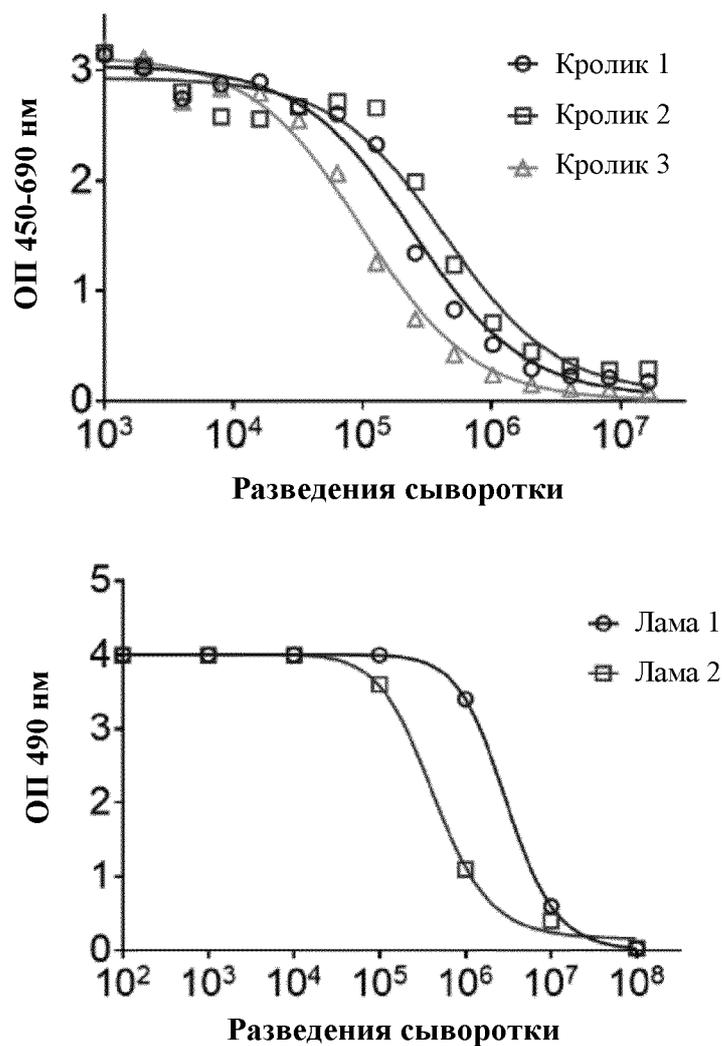
ФИГ. 1



ФИГ. 2



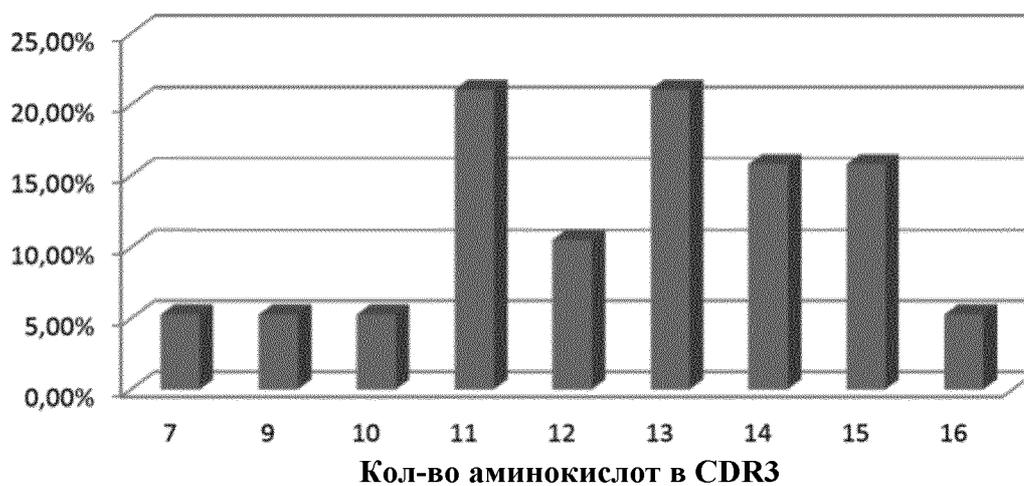
ФИГ. 3А



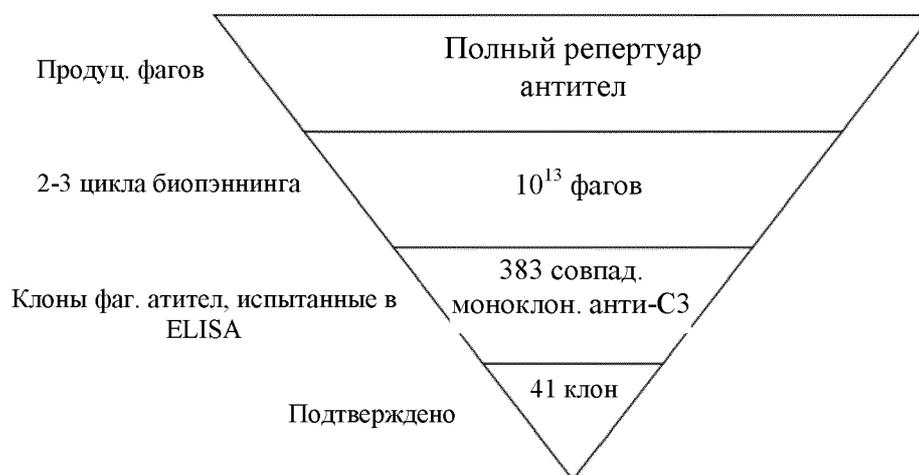
ФИГ. 3В

Библиотека	Разнообразие	Точность инсерции
РТХ-С3-001-Vk	$1,0 \times 10^9$	97.6%
РТХ-С3-002-VL	$2.2 \times 10^9$	97.6%
QV-С3-001	$3.2 \times 10^8$	100%
QV-С3-002	$1.6 \times 10^8$	100%

ФИГ. 4А

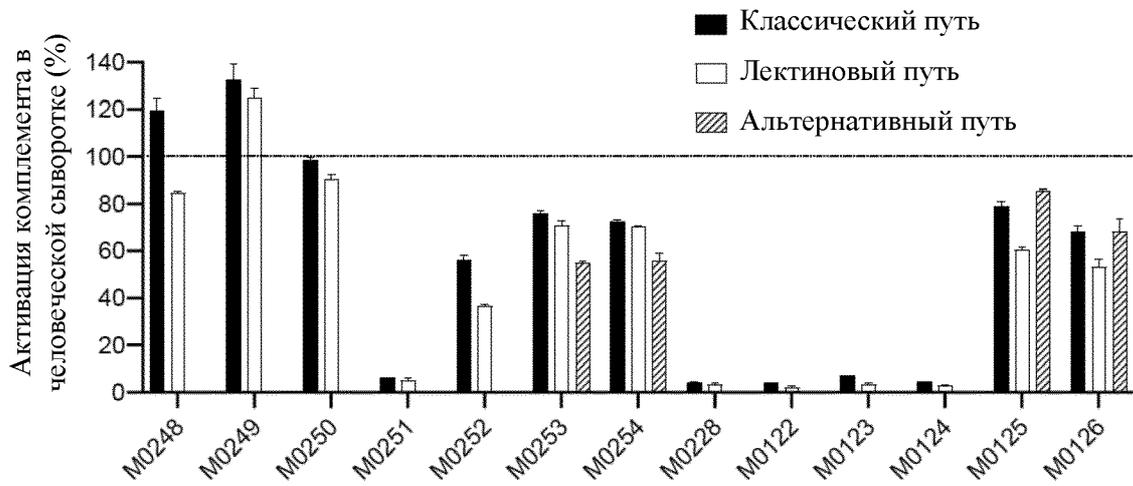


ФИГ. 4В



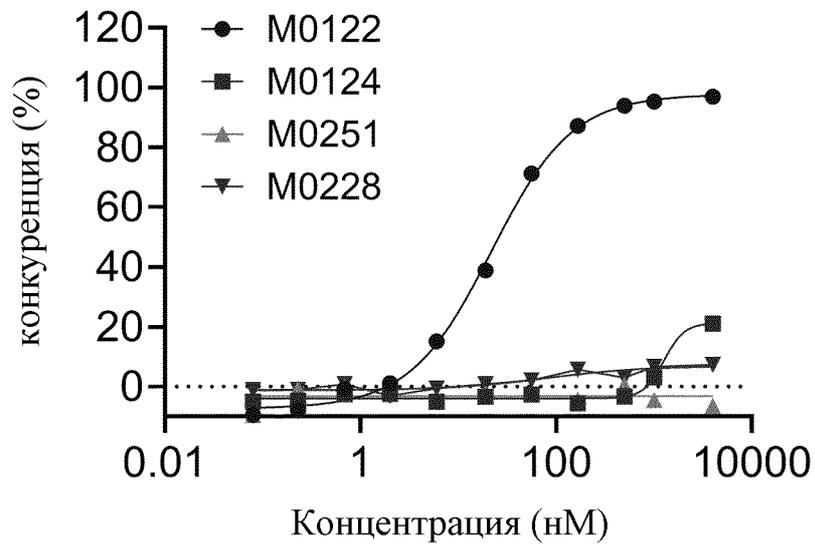
На основе ELISA и ДНК-фингерпринта 41 клон отобран для секвенирования и дальнейшей характеристики

ФИГ. 5

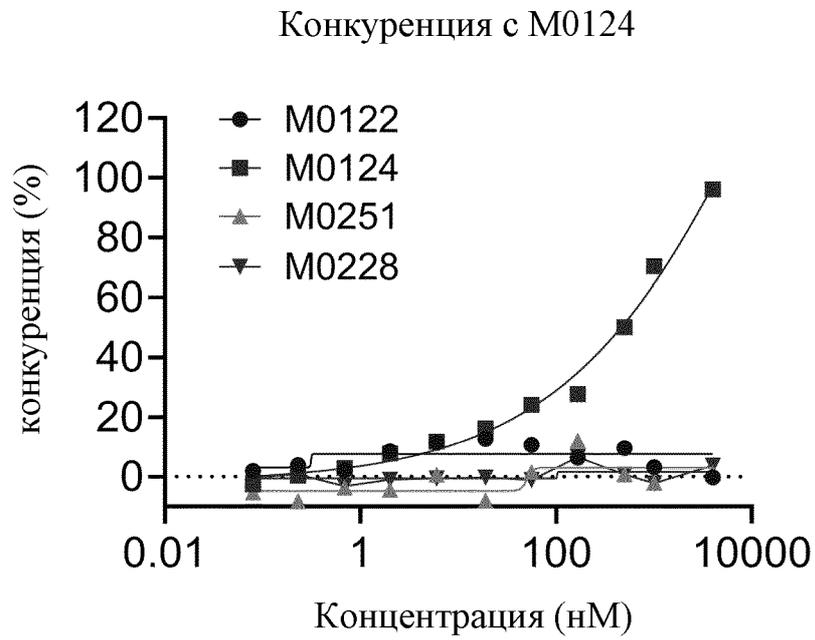


ФИГ. 6

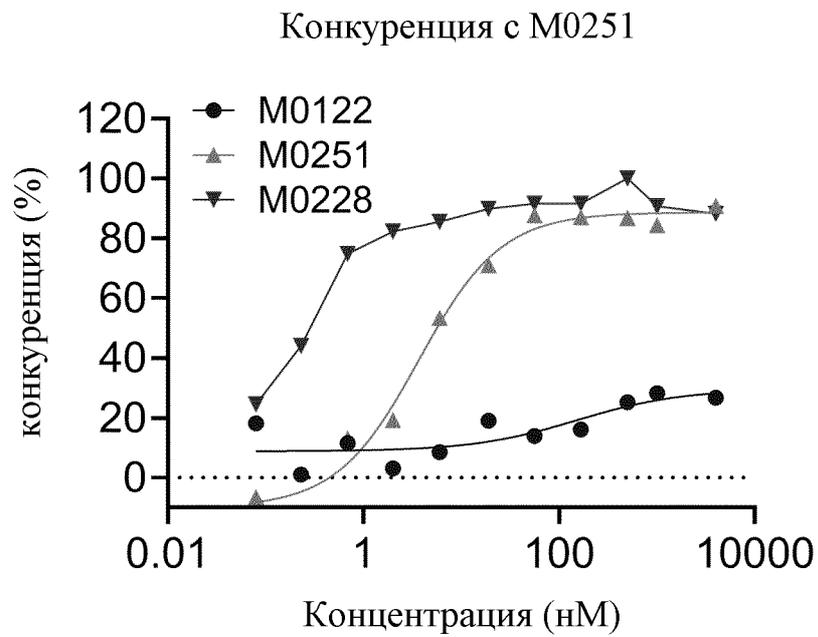
## Конкуренция с M0122



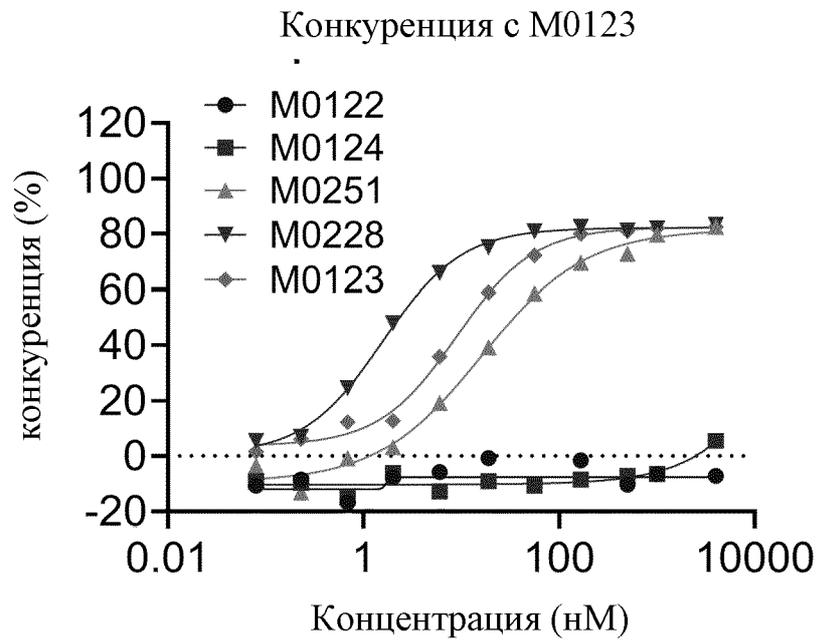
ФИГ. 7А



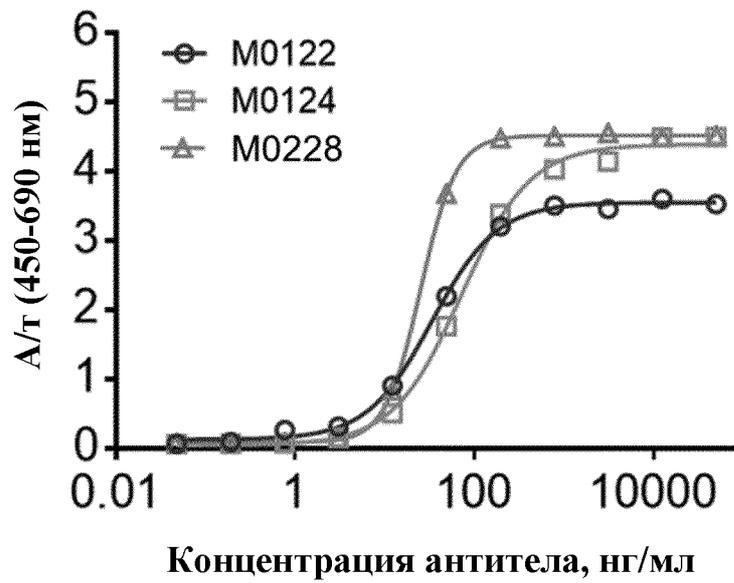
ФИГ. 7В



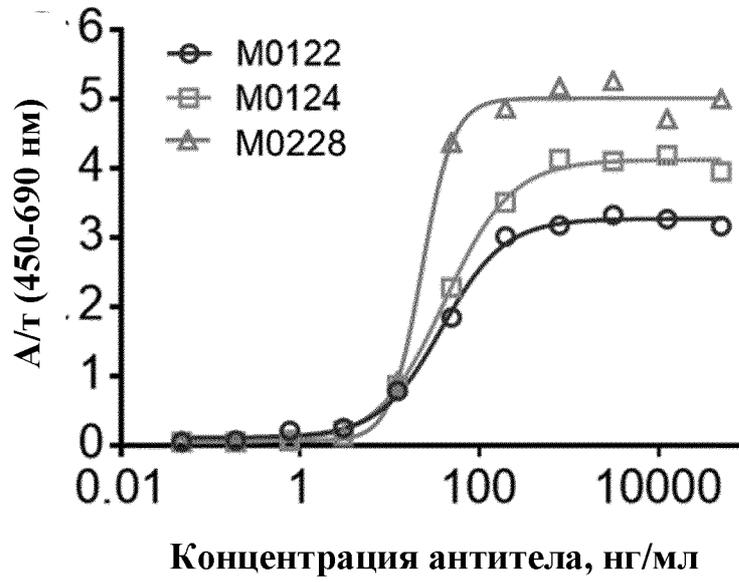
ФИГ. 7С



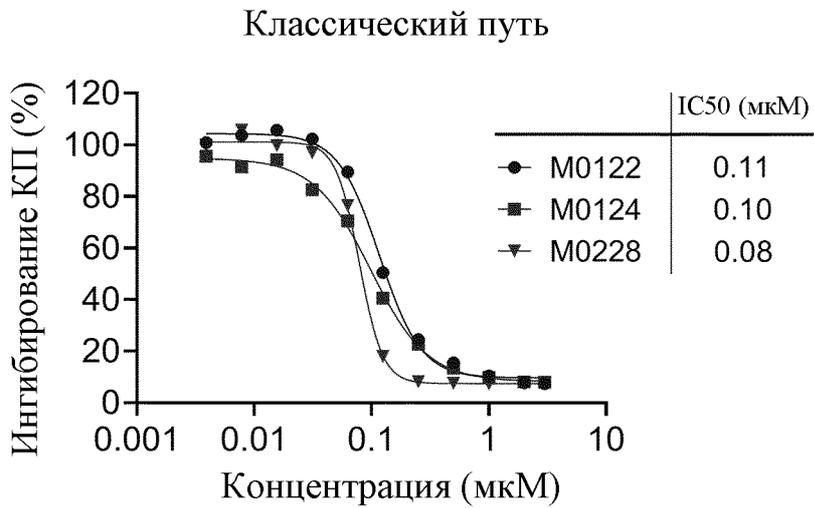
ФИГ. 7D



ФИГ. 8A

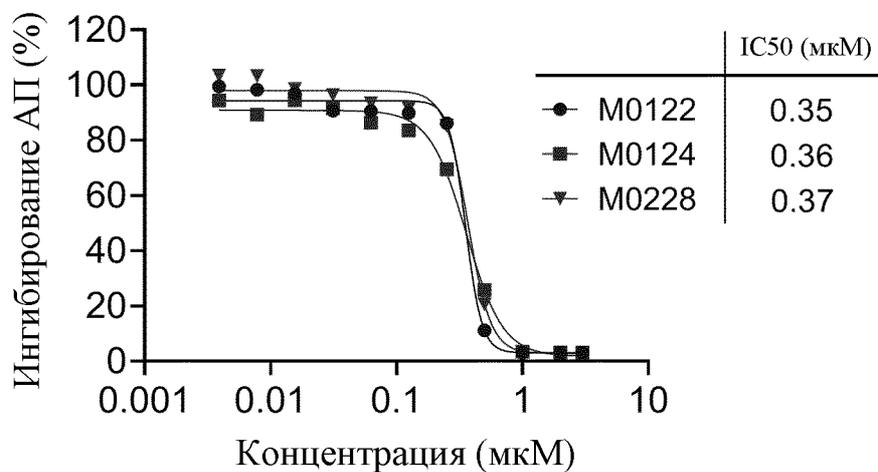


ФИГ. 8В



ФИГ. 9А

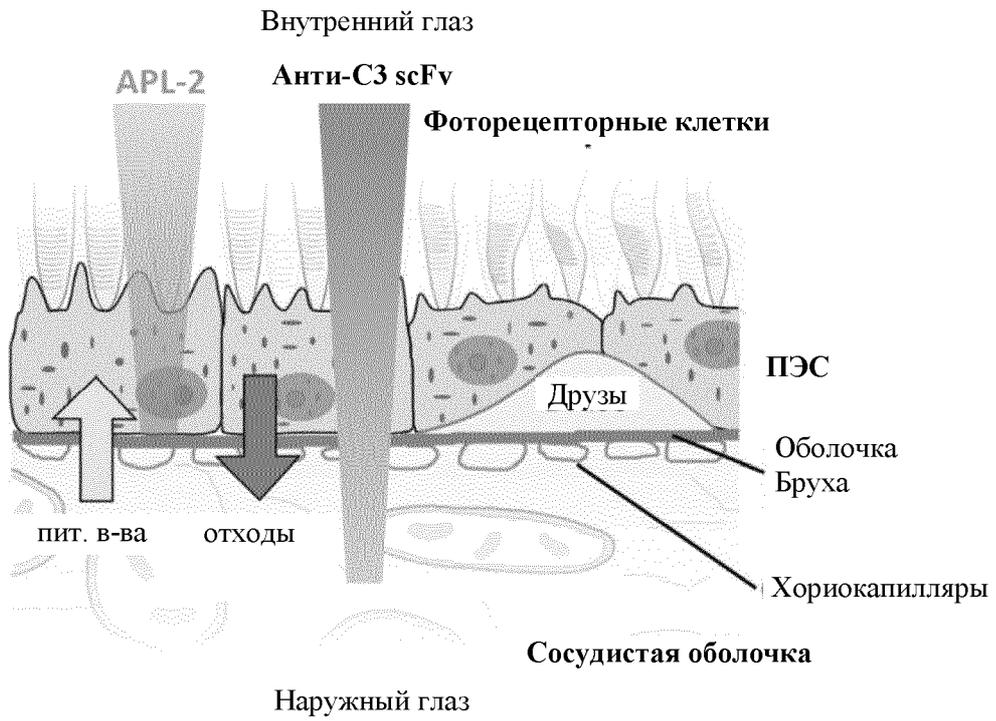
## Альтернативный путь



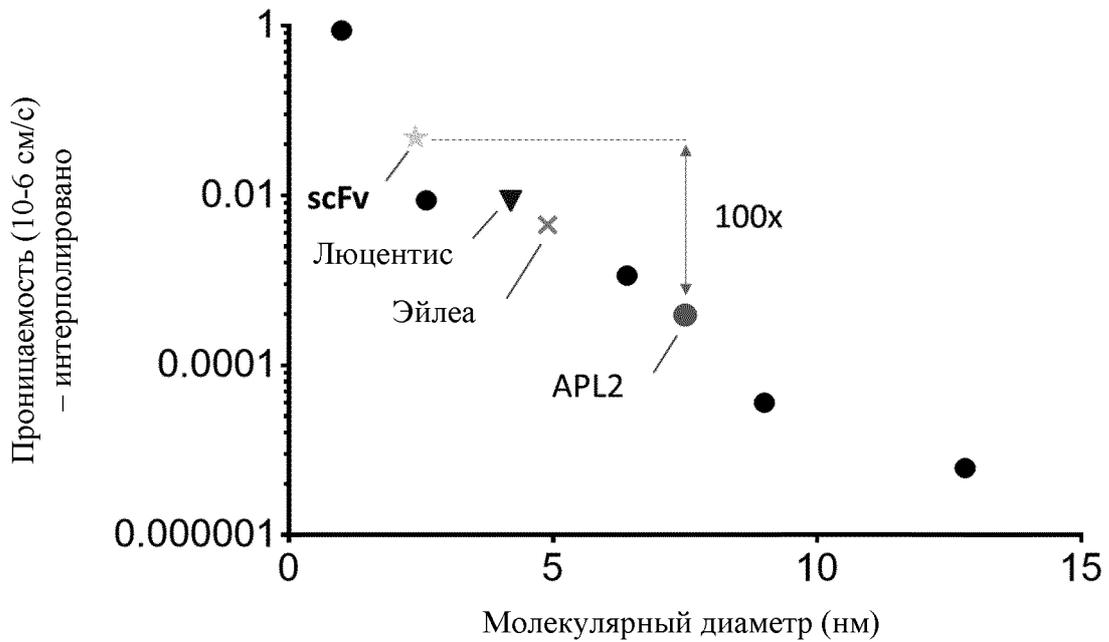
ФИГ. 9В

ID	KD (M)	ка (1/Мс)	кд (1/с)	Rmax
M0228	1.99E-10	5.57E+05	1.11E-04	0.0744
M0122	5.28E-11	8.90E+04	4.70E-06	0.3153
M0124	1.24E-11	4.16+06	5.18E-05	0.1291

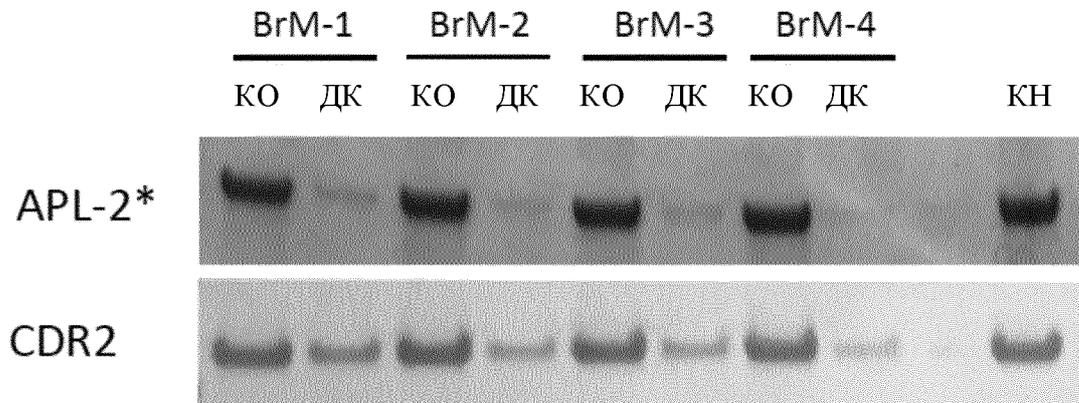
ФИГ. 10



ФИГ. 11



ФИГ. 12



Верх: окрашивание йодидом бария (ПЭГ); низ: окрашивание Кумасси (белок)

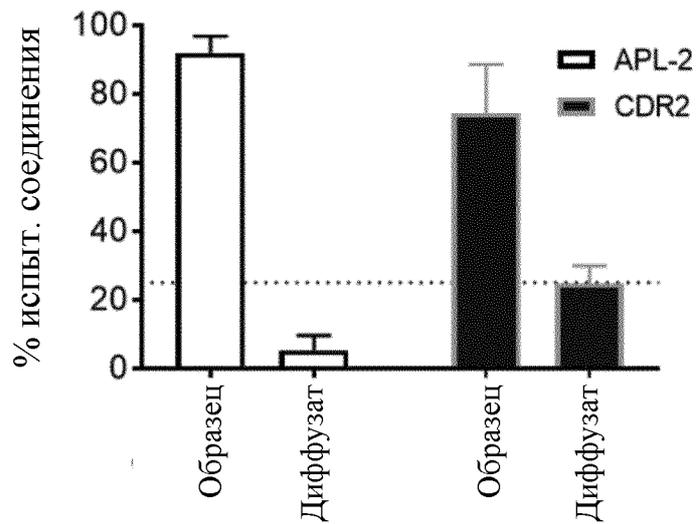
КО ... Камера для образцов

ДК ... Диффузатная камера

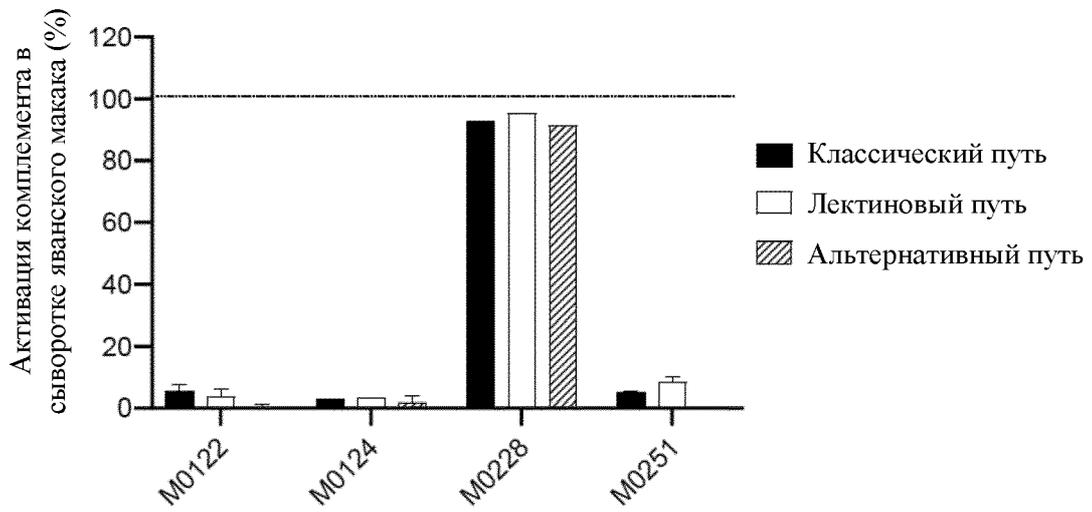
КН ... Контроль нагрузки

\* Суррогат APL2: один компонент APL-1 на 40 кДа линейном ПЭГ

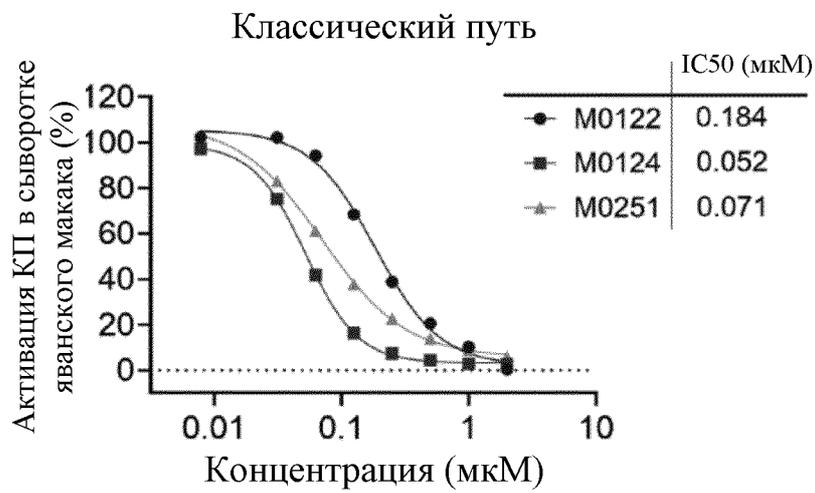
ФИГ. 13А



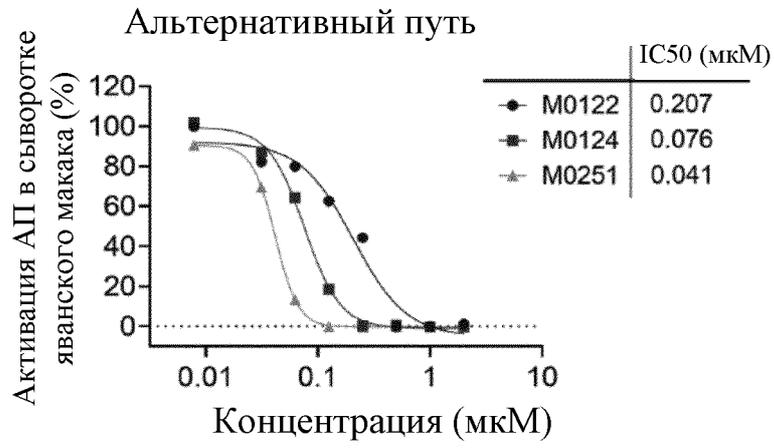
ФИГ. 13В



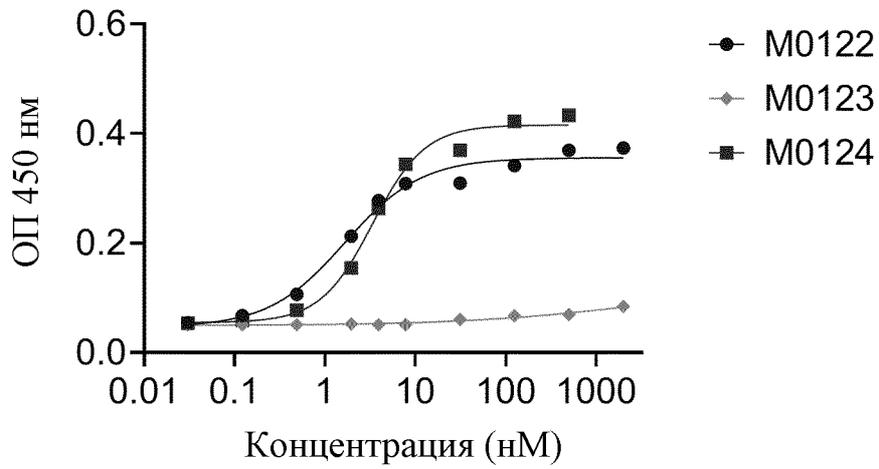
ФИГ. 14А



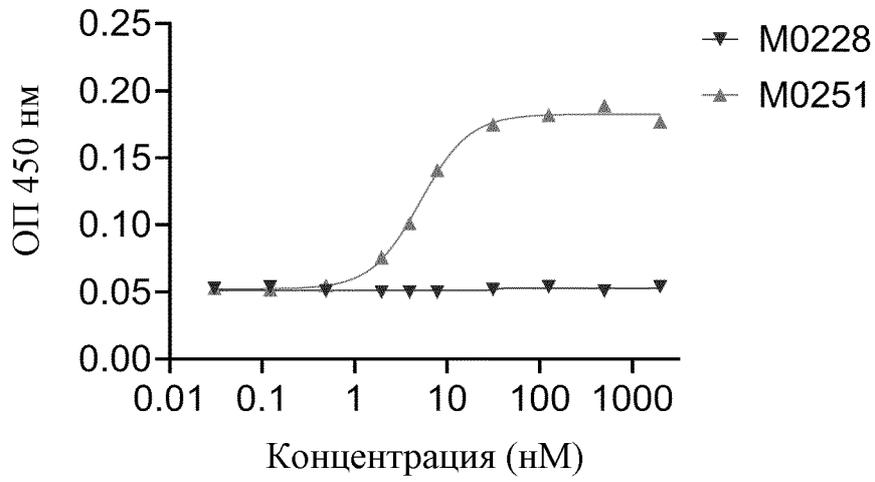
ФИГ. 14В



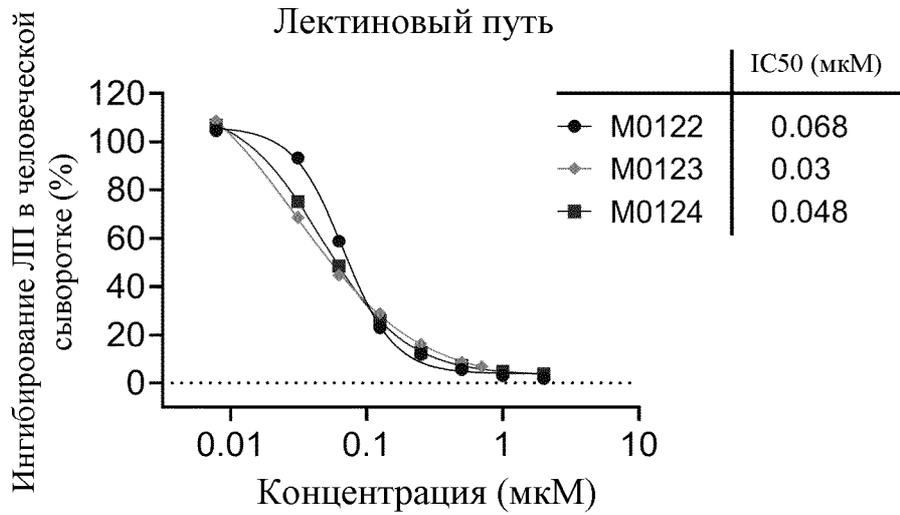
ФИГ. 14С



ФИГ. 15А



ФИГ. 15В



ФИГ. 16