

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392877** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.12.12

(51) Int. Cl. *C12N 15/13* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.04.14

(54) **АНТИТЕЛО ПРОТИВ C1s**

(31) 2021-068964

(72) Изобретатель:

(32) 2021.04.15

Кога Хикару (JP)

(33) JP

(74) Представитель:

(86) PCT/JP2022/017780

**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)**

(87) WO 2022/220275 2022.10.20

(71) Заявитель:

**ЧУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ
КАЙСЯ (JP)**

(57) В изобретении предложены антитела, которые содержат антигенсвязывающую область и константную область антитела и которые связываются с C1s pH-зависимым образом. В заявке предложены также фармацевтические композиции, содержащие любое из указанных антител, и способы лечения индивидуума, имеющего опосредуемое комплементом заболевание или нарушение, или способы профилактики индивидуума, который имеет риск опосредуемого комплементом заболевания или нарушения, где способ включает введение любого из антител индивидууму.

202392877

A1

A1

202392877

АНТИТЕЛО ПРОТИВ C1s

5 Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к антителам, таким как антитела против C1s, и способам их применения.

Предпосылки создания изобретения

10 C1-комплекс представляет собой крупный белковый комплекс, который функционирует в качестве имеющего решающее значение инициатора каскада активации (комплемента) по классическому пути. C1-комплекс состоит из трех компонентов, C1q, C1r и C1s, которые присутствуют в молярном соотношении 1:2:2 соответственно (NPL 1). Классический путь иницируется, когда C1-комплекс связывается с мишенью, которая связана с антителами. C1q, который
15 имеет 6 глобулярных "головок", опосредует связывание C1-комплекса с антителами посредством avidного взаимодействия с Fc-областями. После тесного связывания с мишенью C1r в составе C1-комплекса самоактивируется и становится ферментативно активным. После этого активированный C1r расщепляет и активирует профермен C1s в C1-комплексе (NPL 2). Далее
20 активированный C1s расщепляет его субстраты, т.е. компоненты системы комплемента C2 и C4, до C2a/C2b- и C4a/C4b-фрагментов соответственно. Это приводит к образованию на поверхности мишени C4b2a, C3-конвертазы, которая расщепляет C3 с образованием C3b. C3b в свою очередь расщепляет C5, иницируя образование терминального мембраноатакующего комплекса C5b, C6, C7, C8 и C9, который лизирует мишень посредством образования пор.
25

Оба белка C1s и C1r имеют идентичную организацию доменов в виде CUB1-EGF-CUB2-CCP1-CCP2-сериновой протеазы (NPL 3). Домен CUB1-EGF-CUB2 опосредует взаимодействие между C1r и C1s с образованием тетрамера C1r2s2 (NPL 4), а также между C1r2s2 и C1q (NPL 5). В противоположность
30 этому, домены CCP1-CCP2-сериновой протеазы C1r и C1s ответственны за протеолитическое расщепление соответствующих им субстратов (NPL 6, NPL 7). Тетрамер C1r2s2 взаимодействует с шестью стеблями в C1q через шесть связывающих сайтов в доменах CUB1-EGF-CUB2 тетрамера (NPL 5).

В то время как правильно функционирующая система комплемента защищает хозяина от патогенов, нарушение регуляции или несоответствующая активация классического пути приводит к различным опосредуемым комплементом нарушениям, таким как (но ограничиваясь только ими) аутоиммунные гемолитические анемии (АНА), болезнь Бехчета, буллезная пузырчатка (ВР), иммунная тромбоцитопеническая пурпура (ИТП) и т.д. Таким образом, ингибирование чрезмерной или неконтролируемой активации классического пути может приносить клиническую пользу пациентам с такими нарушениями.

10 Опубликованы данные о том, что HI532, т.е. антитело, которое связывается с бета-доменом C1s, обладает способностью ингибировать взаимодействие C1r2s2 с C1q (NPL 8). Однако это антитело не обладало способностью полностью нейтрализовать гемолитическую активность человеческой сыворотки, и 30% активности сохранялось даже после 24-часовой инкубации сыворотки с антителом.

15 Антитела представляют собой очень привлекательные фармацевтические средства, поскольку они обладают стабильностью в плазме, обладают высокой специфичностью в отношении их мишени и, как правило, обладают превосходными фармакокинетическими профилями. Однако из-за большого размера их молекул, доза терапевтических антител, как правило, является высокой. В случае мишеней, которые присутствуют в большом количестве, требуемая терапевтическая доза антител является еще более высокой. Поэтому методы, улучшающие фармакокинетику, фармакодинамику и антигенсвязывающие свойства антител, представляют собой привлекательные пути снижения дозировки и высоких затрат, связанных с производством терапевтических антител.

20 Антитела, которые связываются с антигеном рН-зависимым образом (ниже в настоящем описании обозначенные также как "рН-зависимое антитело" или "антитело с рН-зависимым связыванием"), характеризуются тем, что одна молекула антитела может нейтрализовать несколько молекул антигена (NPL 9, PTL 1). рН-зависимое антитело обладает способностью к сильному связыванию с его антигеном в условиях нейтрального рН в плазме, но диссоциирует от антигена в условиях кислого рН внутри

эндосомы клетки. После диссоциации от антигена антитело возвращается обратно в плазму с помощью рецепторов FcRn, тогда как диссоциированные антигены разрушаются в лизосоме клетки. После возвращения обратно в плазму антитело вновь становится свободным для связывания с молекулами антигена и их нейтрализации, и этот процесс продолжает повторяться до тех пор, пока антитело остается в кровотоке.

Перечень процитированных документов

Патентная литература

[PTL 1] WO 2009/125825.

10 Непатентная литература

[NPL 1] Wang и др., Mol Cell. 63(1), 7 июля 2016 г., сс. 135-145.

[NPL 2] Mortensen и др., Proc Natl Acad Sci U S A. 114(5), 31 января 2017 г., сс. 986-991.

[NPL 3] Gal и др., Mol Immunol. 46(14), сентябрь 2009 г., сс. 2745-2752.

15 [NPL 4] Almitairi и др., Proc Natl Acad Sci U S A. 115(4), 23 января 2018 г., сс. 768-773.

[NPL 5] Bally и др., J Biol Chem. 284(29), 17 июля 2009 г., сс. 19340-19348.

[NPL 6] Rossi и др., J Biol Chem. 273(2), 9 января 1998 г., сс. 1232-1239.

20 [NPL 7] Lacroix и др., J Biol Chem. 276(39), 28 сентября 2001 г., сс. 36233-36240.

[NPL 8] Tseng и др., Mol Immunol. 34(8-9), июнь 1997 г., сс. 71-79.

[NPL 9] Igawa и др., Nat Biotechnol. 28(11), ноябрь 2010 г., сс. 1203-1207.

Краткое изложение сущности изобретения

Задача, положенная в основу настоящего изобретения

25 В изобретении предложены антитела к компоненту комплемента, такие как антитела против C1s, содержащие их фармацевтические композиции и способы их применения.

Средства решения задачи

30 Согласно одному из вариантов осуществления изобретения в настоящем изобретении предложены антитела, которые содержат антигенсвязывающую область и константную область антитела, которые имеют функцию, способствующую диссоциации (функцию вытеснения), состоящую в том, что антитело связывается с комплексом C1qgs и способствует диссоциации C1q от

комплекса C1qgs, и/или имеют блокирующую функцию, состоящую в том, что антитело связывается с C1r2s2 и ингибирует связывание C1q с C1r2s2 и связывается с C1s рН-зависимым образом. В конкретном варианте осуществления изобретения антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, имеют мутантную константную область, содержащую по меньшей мере одно аминокислотное изменение, которое снижает FcγR-связывающую активность, и/или по меньшей мере одно аминокислотное изменение, которое снижает изоэлектрическую точку (pI) Fc-области.

В частности, вариантами осуществления настоящего изобретения являются:

[1] Выделенное антитело, которое содержит антигенсвязывающую область и константную область антитела,

где антитело способствует диссоциации C1q от комплекса C1qgs и/или ингибирует связывание C1q с C1r2s2, и

в котором антигенсвязывающая область содержит комбинацию HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, выбранную из группы, которая состоит из участков, указанных ниже в подпунктах 1)-6):

1) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 60, 61 и 62 соответственно;

2) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 37, 38, 39, 56, 57 и 58 соответственно;

3) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 56, 57 и 58 соответственно;

4) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 48, 49 и 50 соответственно;

5) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 52, 53 и 54 соответственно; и

6) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 33, 34, 35, 56, 57 и 58 соответственно.

5 [2] Антитело по п. [1], где антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), выбранную из группы, которая состоит из областей, указанных ниже в подпунктах 1)-6):

1) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 24 и 59 соответственно;

10 2) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 36 и 55 соответственно;

3) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 24 и 55 соответственно;

4) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 24 и 47 соответственно;

15 5) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 28 и 51 соответственно; и

6) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 32 и 55 соответственно.

20 [3] Антитело по п.[1] или п. [2], для которого соотношение величины KD в диапазоне кислых значений pH и величины KD в диапазоне нейтральных значений pH, т.е. соотношение KD в кислой среде/KD в нейтральной среде, составляет 107 или более.

25 [4] Антитело по одному из п.п. [1]-[3], в котором антигенсвязывающая область может специфически связываться с доменом CUB1-EGF-CUB2 человеческого C1s.

[5] Антитело по одному из п.п. [1]-[4], где антитело имеет мутантную константную область, содержащую по меньшей мере одно аминокислотное изменение, которое снижает связывающую активность в отношении Fcγ-рецептора.

30 [6] Антитело по п. [5], в котором мутантная константная область содержит аминокислотное изменение по меньшей мере в одном из положений 235 и 236 согласно EU-нумерации.

[7] Антитело по одному из п.п. [1]-[6], где антитело имеет мутантную константную область, содержащую по меньшей мере одно аминокислотное изменение, и в котором аминокислотное изменение снижает изоэлектрическую точку (pI) мутантной константной области по сравнению с изоэлектрической точкой родительской константной области.

[8] Антитело по п. [7], в котором мутантная константная область содержит аминокислотное изменение по меньшей мере в одном из положений 137, 268, 274, 355 и 419 согласно EU-нумерации.

[9] Антитело по одному из п.п. [1]-[8], где величина pI составляет 7,8 или менее.

[10] Антитело по одному из п.п. [1]-[8], в котором константная область содержит константную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и константную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

[11] Антитело, обладающее связывающей активностью в отношении C1s, где антитело содержит комбинацию HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, выбранную из группы, которая состоит из участков, указанных ниже в подпунктах 1)-6):

1) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 60, 61 и 62 соответственно;

2) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 37, 38, 39, 56, 57 и 58 соответственно;

3) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 56, 57 и 58 соответственно;

4) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 48, 49 и 50 соответственно;

5) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 52, 53 и 54 соответственно; и

6) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 33, 34, 35, 56, 57 и 58 соответственно.

[12] Антитело по п. [11], где антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), выбранную из группы, которая состоит из областей, указанных ниже в подпунктах 1)-6):

1) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 24 и 59 соответственно;

2) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 36 и 55 соответственно;

3) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 24 и 55 соответственно;

4) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 24 и 47 соответственно;

5) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 28 и 51 соответственно; и

6) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 32 и 55 соответственно.

[13] Антитело по п. [11] или п. [12], где константная область антитела содержит константную область H-цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и константную область L-цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

[14] Антитело, содержащее тяжелую цепь (H-цепь) и легкую цепь (L-цепь), выбранную из группы, которая состоит из цепей, указанных ниже в подпунктах 1)-6):

1) H-цепь и L-цепь, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 66 и 67 соответственно;

2) H-цепь и L-цепь, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 68 и 69 соответственно;

3) N-цепь и L-цепь, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 70 и 71 соответственно;

4) N-цепь и L-цепь, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 72 и 73 соответственно;

5) 5) N-цепь и L-цепь, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 74 и 75 соответственно; и

6) N-цепь и L-цепь, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 76 и 77 соответственно.

10 [15] Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по одному из п.п. [1]-[14] и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

[16] Фармацевтическая композиция по п. [15], которая предназначена для применения для лечения индивидуума, имеющего опосредуемое комплементом заболевание или нарушение, или для профилактики индивидуума, который может иметь опосредуемое комплементом заболевание или нарушение.

15 [17] Способ лечения индивидуума, имеющего опосредуемое комплементом заболевание или нарушение, или профилактики индивидуума, который может иметь опосредуемое комплементом заболевание или нарушение, где способ включает введение индивидууму в эффективном количестве антитела по одному из п.п. [1]-[14].

20 [18] Антитело по одному из п.п. [1]-[14], которое предназначено для лечения или профилактики опосредуемого комплементом заболевания или нарушения.

25 [19] Терапевтический или профилактический агент, предназначенный для опосредуемого комплементом заболевания или нарушения, где агент содержит антитело по одному из п.п. [1]-[14].

[20] Применение антитела по одному из п.п. [1]-[14] для приготовления терапевтического или профилактического агента, предназначенного для опосредуемого комплементом заболевания или нарушения.

30 [21] Выделенное антитело, содержащее антигенсвязывающую область и константную область антитела,

для которого соотношение величины KD в диапазоне кислых значений pH и величины KD в диапазоне нейтральных значений pH, т.е. соотношение KD в кислой среде/KD в нейтральной среде, составляет 107 или более, и

где константная область антитела содержит по меньшей мере одно аминокислотное изменение, которое снижает связывающую активность в отношении Fc γ -рецептора, и по меньшей мере одно аминокислотное изменение, которое снижает изоэлектрическую точку (pI).

5 Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1-1 - изменение концентраций антитела в плазме самцов обезьян циномоглус (яванский макак-крабоед) после однократного внутривенного введения антител COS0637pHv2-FcgSil, COS0637pHv2-SG1077R, COS0637pHv3-SG1077R и COS0637pHv8-SG1077R (логарифмическая линейная зависимость).
10 Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (N = 3);

на фиг. 1-2 - изменение в соотношении концентрации C1s в плазме самцов обезьян циномоглус после однократного внутривенного введения антител
15 COS0637pHv2-FcgSil, COS0637pHv2-SG1077R, COS0637pHv3-SG1077R и COS0637pHv8-SG1077R и концентрации C1s в плазме до введения (логарифмическая линейная зависимость). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (N = 3);

на фиг. 2-1 - результаты оценки антитела против C1s COS0637pHv8-TT91R
20 в отношении функции вытеснения C1q. Жирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали буфер (C1r2s2+C1q): сенсограмма 1; пунктирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали антитело (C1r2s2+C1q+At): сенсограмма 2; и ломаной линией обозначена сенсограмма,
25 полученная, когда hC1q не инъецировали к hC1r2s2, а инъецировали только антитело (C1r2s2+At): сенсограмма 3. В качестве At инъецировали COS0637pHv8-TT91R;

на фиг. 2-2 - результаты оценки антитела против C1s COS0637pHv15-TT91R
30 в отношении функции вытеснения C1q. Жирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали буфер (C1r2s2+C1q): сенсограмма 1; пунктирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали антитело (C1r2s2+C1q+At): сенсограмма 2; и ломаной линией обозначена сенсограмма,

полученная, когда hC1q не инъецировали к hC1r2s2, а инъецировали только антитело (C1r2s2+Ат): сенсограмма 3. В качестве Ат инъецировали COS0637pHv15-ТТ91R;

5 на фиг. 2-3 - результаты оценки антитела против C1s COS0637pHv16-ТТ91R в отношении функции вытеснения C1q. Жирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали буфер (C1r2s2+C1q): сенсограмма 1; пунктирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали антитело (C1r2s2+C1q+Ат): сенсограмма 2; и ломаной линией обозначена сенсограмма,
10 полученная, когда hC1q не инъецировали к hC1r2s2, а инъецировали только антитело (C1r2s2+Ат): сенсограмма 3. В качестве Ат инъецировали COS0637pHv16-ТТ91R;

на фиг. 2-4 - результаты оценки антитела против C1s COS0637pHv17-ТТ91R в отношении функции вытеснения C1q. Жирной линией обозначена сенсограмма,
15 полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали буфер (C1r2s2+C1q): сенсограмма 1; пунктирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали антитело (C1r2s2+C1q+Ат): сенсограмма 2; и ломаной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q не инъецировали к hC1r2s2, а инъецировали только
20 антитело (C1r2s2+Ат): сенсограмма 3. В качестве Ат инъецировали COS0637pHv17-ТТ91R;

на фиг. 2-5 - результаты оценки антитела против C1s COS0637pHv21-ТТ91R в отношении функции вытеснения C1q. Жирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали буфер
25 (C1r2s2+C1q): сенсограмма 1; пунктирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали антитело (C1r2s2+C1q+Ат): сенсограмма 2; и ломаной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q не инъецировали к hC1r2s2, а инъецировали только антитело (C1r2s2+Ат): сенсограмма 3. В качестве Ат инъецировали
30 COS0637pHv21-ТТ91R;

на фиг. 2-6 - результаты оценки антитела против C1s COS0637pHv23-ТТ91R в отношении функции вытеснения C1q. Жирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали буфер

(C1r2s2+C1q): сенсограмма 1; пунктирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали антитело (C1r2s2+C1q+Ат): сенсограмма 2; и ломаной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q не инъецировали к hC1r2s2, а инъецировали только антитело (C1r2s2+Ат): сенсограмма 3. В качестве Ат инъецировали COS0637pHv23-ТТ91R;

на фиг. 2-7 - результаты оценки антитела против C1s COS0637pHv25-ТТ91R в отношении функции вытеснения C1q. Жирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали буфер (C1r2s2+C1q): сенсограмма 1; пунктирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали антитело (C1r2s2+C1q+Ат): сенсограмма 2; и ломаной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q не инъецировали к hC1r2s2, а инъецировали только антитело (C1r2s2+Ат): сенсограмма 3. В качестве Ат инъецировали COS0637pHv25-ТТ91R;

на фиг. 2-8 - результаты оценки антитела против C1s COS0637pHv8-G1A3FcgSil+LowpI в отношении функции вытеснения C1q. Жирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали буфер (C1r2s2+C1q): сенсограмма 1; пунктирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали антитело (C1r2s2+C1q+Ат): сенсограмма 2; и ломаной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q не инъецировали к hC1r2s2, а инъецировали только антитело (C1r2s2+Ат): сенсограмма 3. В качестве Ат инъецировали COS0637pHv8-G1A3FcgSil+LowpI;

на фиг. 2-9 - результаты оценки антитела против C1s COS0637pHv15-G1A3FcgSil+LowpI в отношении функции вытеснения C1q. Жирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали буфер (C1r2s2+C1q): сенсограмма 1; пунктирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали антитело (C1r2s2+C1q+Ат): сенсограмма 2; и ломаной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q не инъецировали к hC1r2s2, а инъецировали только антитело (C1r2s2+Ат): сенсограмма 3. В качестве Ат инъецировали COS0637pHv15-G1A3FcgSil+LowpI;

на фиг. 2-10 - результаты оценки антитела против C1s COS0637pHv16-G1A3FcgSil+LowpI в отношении функции вытеснения C1q. Жирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали буфер (C1r2s2+C1q): сенсограмма 1; пунктирной линией
5 обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали антитело (C1r2s2+C1q+Ат): сенсограмма 2; и ломаной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q не инъецировали к hC1r2s2, а инъецировали только антитело (C1r2s2+Ат): сенсограмма 3. В качестве Ат инъецировали COS0637pHv16-G1A3FcgSil+LowpI;

10 на фиг. 2-11 - результаты оценки антитела против C1s COS0637pHv17-G1A3FcgSil+LowpI в отношении функции вытеснения C1q. Жирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали буфер (C1r2s2+C1q): сенсограмма 1; пунктирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а
15 затем инъецировали антитело (C1r2s2+C1q+Ат): сенсограмма 2; и ломаной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q не инъецировали к hC1r2s2, а инъецировали только антитело (C1r2s2+Ат): сенсограмма 3. В качестве Ат инъецировали COS0637pHv17-G1A3FcgSil+LowpI;

на фиг. 2-12 - результаты оценки антитела против C1s COS0637pHv21-G1A3FcgSil+LowpI в отношении функции вытеснения C1q. Жирной линией
20 обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали буфер (C1r2s2+C1q): сенсограмма 1; пунктирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали антитело (C1r2s2+C1q+Ат): сенсограмма 2; и ломаной
25 линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q не инъецировали к hC1r2s2, а инъецировали только антитело (C1r2s2+Ат): сенсограмма 3. В качестве Ат инъецировали COS0637pHv21-G1A3FcgSil+LowpI;

на фиг. 2-13 - результаты оценки антитела против C1s COS0637pHv23-G1A3FcgSil+LowpI в отношении функции вытеснения C1q. Жирной линией
30 обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали буфер (C1r2s2+C1q): сенсограмма 1; пунктирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали антитело (C1r2s2+C1q+Ат): сенсограмма 2; и ломаной

линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q не инъецировали к hC1r2s2, а инъецировали только антитело (C1r2s2+Ат): сенсограмма 3. В качестве Ат инъецировали COS0637pHv23-G1A3FcgSil+LowpI;

на фиг. 2-14 - результаты оценки антитела против C1s COS0637pHv25-G1A3FcgSil+LowpI в отношении функции вытеснения C1q. Жирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали буфер (C1r2s2+C1q): сенсограмма 1; пунктирной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали антитело (C1r2s2+C1q+Ат): сенсограмма 2; и ломаной линией обозначена сенсограмма, полученная, когда hC1q не инъецировали к hC1r2s2, а инъецировали только антитело (C1r2s2+Ат): сенсограмма 3. В качестве Ат инъецировали COS0637pHv25-G1A3FcgSil+LowpI;

на фиг. 3-1 - изменение концентраций C1s в плазме самцов обезьян циномоглус после однократного внутривенного введения антител COS0637pHv16-G1A3FcgSil+LowpI и COS0637pHv21-G1A3FcgSil+LowpI (логарифмическая линейная зависимость). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (антитело COS0637pHv16-G1A3FcgSil+LowpI; N = 3, антитело COS0637pHv21-G1A3FcgSil+LowpI; N = 2);

на фиг. 3-2 - изменение в соотношении концентрации C1s в плазме самцов обезьян циномоглус после однократного внутривенного введения антител COS0637pHv16-G1A3FcgSil+LowpI и COS0637pHv21-G1A3FcgSil+LowpI и концентрации C1s в плазме до введения (логарифмическая линейная зависимость). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (антитело COS0637pHv16-G1A3FcgSil+LowpI; N = 3, антитело COS0637pHv21-G1A3FcgSil+LowpI; N = 2);

на фиг. 4 - результаты оценки антител против C1s в отношении их функции нейтрализации комплемента у обезьян. Представлены данные об нейтрализующей комплемент активности антител (COS0637pHv2-FcgSil, COS0637pHv2-SG1077R, COS0637pHv3-SG1077R, COS0637pHv8-SG1077R, COS0637pHv16-G1A3FcgSil+LowpI, COS0637pHv21-G1A3FcgSil+LowpI) у обезьян. Все образцы подавляли лизис эритроцитов сразу после введения. Подавление лизиса эритроцитов обнаружено вплоть до 56 дней после введения

антител COS0637pHv16-G1A3FcgSil+LowpI и COS0637pHv21-G1A3FcgSil+LowpI.

Описание вариантов осуществления изобретения

Технологии и процедуры, которые описаны или на которые сделаны ссылки
5 в настоящем описании, в целом, хорошо известны и специалисты в данной
области широко их применяют с использованием общепринятых методологий,
таких, например, как описанные у Sambrook и др., Molecular Cloning: A
Laboratory Manual, 3-е изд., изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold
Spring Harbor, N.Y. 2001; Current Protocols in Molecular Biology (под ред. F.M.
10 Ausubel и др., 2003); серии Methods in Enzymology, (изд-во Academic Press, Inc.);
PCR 2: A Practical Approach (под ред. M.J. MacPherson, B.D. Hames и G.R. Taylor,
1995), Antibodies, A Laboratory Manual (под ред. Harlow и Lane, 1988) и Animal
Cell Culture (под ред. R.I. Freshney, 1987); Oligonucleotide Synthesis (под ред.
M.J. Gait, 1984); Methods in Molecular Biology, изд-во Humana Press; Cell Biology:
15 A Laboratory Notebook (под ред. J.E. Cellis, 1998), из-во Academic Press; Animal
Cell Culture (под ред. R.I. Freshney, 1987); J. P. Mather и P.E. Roberts, Introduction
to Cell and Tissue Culture, изд-во Plenum Press, 1998; Cell and Tissue Culture:
Laboratory Procedures (под ред. A. Doyle, J.B. Griffiths и D.G. Newell), изд-во J.
Wiley and Sons, 1993-1998; Handbook of Experimental Immunology (под ред. D.M.
20 Weir и C.C. Blackwell); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (под ред. J.M.
Miller и M.P. Calos, 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction (под ред. Mullis и
др., 1994); Current Protocols in Immunology (под ред. J.E. Coligan и др., 1991);
Short Protocols in Molecular Biology (изд-во Wiley and Sons, 1999); C.A. Janeway и
P. Travers, Immunobiology, 1997; P. Finch, Antibodies, 1997; Antibodies: A
25 Practical Approach (под ред. D. Catty, изд-во IRL Press, 1988-1989); Monoclonal
Antibodies: A Practical Approach (под ред. P. Shepherd и C. Dean, изд-во Oxford
University Press, 2000); E. Harlow и D. Lane, Using Antibodies: A Laboratory
Manual (изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (под
ред. M. Zanetti и J. D. Capra, изд-во Harwood Academic Publishers, 1995); и
30 Cancer: Principles and Practice of Oncology (под ред. V.T. DeVita и др., изд-во J.B.
Lippincott Company, 1993).

I. Определения

Если не указано иное, то технические и научные понятия, применяемые в настоящем описании, имеют значения, хорошо известные обычному специалисту в области, в которой относится настоящее изобретение. У Singleton и др.,
5 Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2-ое изд., изд-во J. Wiley & Sons (New York, N.Y., 1994) и March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4-ое изд., изд-во John Wiley & Sons (New York, N.Y., 1992), для специалистов в данной области представлено в целом толкование многих понятий, применяемых в настоящей заявке. Все процитированные в
10 настоящем описании ссылки, включая заявки на патент и публикации патентов, в полном объеме включены в него в качестве ссылки.

Для интерпретации настоящего описания изобретения следует применять приведенные ниже понятия, и, если это возможно, понятия, применяемые в единственном числе, включают также их применение во множественном числе и
15 наоборот. Должно быть очевидно, что применяемая в настоящем описании терминология представлена только для цели описания конкретных вариантов осуществления изобретения и не направлена на ограничение его объема. В случае, если любое указанное ниже определение вступает в противоречие с указанным в любом документе, включенном в описание в качестве ссылки, то
20 следует использовать указанное ниже определение.

Для целей настоящего описания "акцепторный человеческий каркасный участок" означает каркасный участок, который содержит аминокислотную последовательность каркасного участка варибельного домена легкой цепи (VL) или каркасного участка варибельного домена тяжелой цепи (VH), имеющую
25 происхождение из каркасного участка человеческого иммуноглобулина или человеческого консенсусного каркасного участка, указанного ниже.

Акцепторный человеческий каркасный участок, «имеющий происхождение из» каркасного участка человеческого иммуноглобулина или человеческого консенсусного каркасного участка, может иметь такую же аминокислотную
30 последовательность или может содержать изменения в аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения количество аминокислотных изменений составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее или 2

или менее. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность человеческого акцепторного каркасного участка VL идентична последовательности каркасного участка VL человеческого иммуноглобулина или последовательности человеческого консенсусного каркасного участка.

5 Понятие "аффинность" относится к суммарной силе всех нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). В контексте настоящего описания, если не указано иное, "аффинность связывания" относится к присущей молекуле аффинности связывания, отражающей взаимодействие по типу 1:1 между компонентами связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y, как правило, можно характеризовать с помощью константы диссоциации (K_d или KD). Аффинность можно оценивать с помощью общепринятых методов, известных в данной области, включая те, которые представлены в настоящем описании. Конкретные приведенные в качестве иллюстрации и примера варианты измерения аффинности связывания представлены ниже. Понятия "аффинность", "аффинность связывания", "связывающая способность" и "связывающая активность" можно использовать взаимозаменяемо. Понятие «связывающая активность» относится к суммарной силе всех нековалентных взаимодействий между одним или несколькими сайтами связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). В контексте настоящего описания связывающая активность не ограничена строго активностью, которая отражает взаимодействие по типу 1:1 между компонентами связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Когда компоненты связывающейся пары могут связываться друг с другом как посредством одновалентного, так и многовалентного связывания, то связывающая активность представляет собой силу суммарного связывания всех указанных связываний. Связывающую активность молекулы X к ее партнеру Y, как правило, можно характеризовать с помощью константы диссоциации (KD). Альтернативно этому, для оценки связывания можно применять константы скорости ассоциации и диссоциации (K_{on} и K_{off}). Связывающую активность можно оценивать с помощью общепринятых методов, известных в данной

области, включая те, которые представлены в настоящем описании. Конкретные приведенные в качестве иллюстрации и примера варианты измерения аффинности связывания представлены ниже.

5 Антитело "с созревшей аффинностью" означает антитело с одним или несколькими изменениями в одном или нескольких гипервариабельных участках (HVR) по сравнению с родительским антителом, которое не содержит указанных изменений, указанные изменения приводят к улучшению аффинности антитела к антигену.

10 Понятия "антитело против C1s" и "антитело, которое связывается с C1s" относятся к антителу, которое обладает способностью связываться с C1s с аффинностью, достаточной для того, чтобы антитело можно было применять в качестве диагностического и/или терапевтического агента, мишенью которого является C1s. В одном из вариантов осуществления изобретения уровень связывания антитела против C1s с неродственным не представляющим собой
15 C1s белком составляет менее чем примерно 10% от связывания антитела с C1s по данным измерений, полученным, например, с помощью радиоиммуноанализа (РИА). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, которое связывается с C1s, имеет константу диссоциации (K_d) 1 микромоль (мкМ) или менее, 100нМ или менее, 10нМ или менее, 1нМ или менее, 0,1нМ или менее,
20 0,01нМ или менее или 0,001нМ или менее (например, 10^{-8} М или менее, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против C1s связывается с эпитопом C1s, который является консервативным для C1s из различных видов

В контексте настоящего описания понятие "антитело" используется в его
25 наиболее широком смысле и относится к различным структурам антител, включая (но не ограничиваясь только ими) моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они обладают требуемой антигенсвязывающей активностью.

30 Понятие "фрагмент антитела" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, связывающуюся с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антитела включают (но не ограничиваясь только ими) Fv,

Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; димерные антитела (диабоды); линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv) и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

5 Понятие "антитело, которое связывается с тем же эпитопом", что референс-антитело, относится к антителу, которое блокирует связывание референс-антитела с его антигеном при оценке с помощью анализа в условиях конкуренции (конкурентный анализ) на 50% или более, и, наоборот, референс-антитело блокирует связывание антитела с его антигеном при оценке с помощью конкурентного анализа на 50% или более. Пример конкурентного анализа
10 представлен в настоящем описании.

 Понятие "химерное" антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи имеет происхождение из конкретного источника или вида, а остальная часть тяжелой и/или легкой цепи имеет происхождение из другого источника или вида.

15 Понятие "класс" антитела относится к типу константного домена или константной области, который/которая входит в его тяжелую цепь. Известно пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM и некоторые из них можно подразделять дополнительно на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелой цепи, которые
20 соответствуют различным классам иммуноглобулинов, обозначают как альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю соответственно.

 Понятие "цитотоксический агент" в контексте настоящего описания относится к субстанции, которая ингибирует клеточную функцию или препятствует ей и/или вызывает клеточную гибель или деструкцию.

25 Цитотоксические агенты включают (но не ограничиваясь только ими) радиоактивные изотопы (например, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² и радиоактивные изотопы Lu); химиотерапевтические агенты или лекарственные средства (например, метотрексат, адриамицин, алкалоиды барвинка (винкристин, винбластин, этопозид), доксорубицин, мелфалан,
30 митомицин С, хлорамбуцил, даунорубицин или другие интеркалирующие агенты); ингибирующие рост агенты; ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты; антибиотики; токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины

бактериального, грибного, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты; и различные противоопухолевые или противораковые агенты, указанные ниже.

5 Понятие "эффекторные функции" относится к тем видам биологической активности, которые связаны с Fc-областью антитела, которые варьируются в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (CDC); связывание Fc-рецептора; антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающую регуляцию рецепторов

10 клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора) и активацию B-клеток.

 Понятие "эффективное количество" агента, например, фармацевтической композиции, означает количество, эффективное в дозах и в течение периода времени, необходимых для достижения требуемого терапевтического или

15 профилактического результата.

 Понятие "эпитоп" включает любую детерминанту, обладающую способностью связываться с антителом. Эпитоп представляет собой область антигена, которая связывается с антителом, мишенью которого является антиген, и включает специфические аминокислоты, которые непосредственно

20 контактируют с антителом. Эпитопные детерминанты могут включать химически активные поверхностные группы молекул, таких как аминокислоты, боковые сахарные цепи, фосфорильные или сульфонильные группы, и могут иметь специфические характеристики трехмерной структуры и/или специфические характеристики зарядов. Как правило, антитела, специфические в

25 отношении конкретного антигена-мишени, должны предпочтительно распознавать эпитоп на антигене-мишени в сложной смеси белков и/или макромолекул.

 Понятие "Fc-область" в контексте настоящего описания относится к C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по

30 меньшей мере часть константной области. Понятие включает нативную последовательность Fc-областей и вариант Fc-областей. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG простирается от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи.

Однако С-концевой лизин (Lys447) или глицин-лизин (остатки 446-447) Fc-области могут присутствовать или отсутствовать. Если специально не указано иное, то нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константной области соответствует системе нумерации EU, которую обозначают также как EU-индекс, описанной у Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Понятие "каркасный участок" или "FR" означает остатки вариабельного домена, отличные от остатков гипервариабельного участка (HVR). FR вариабельного домена, как правило, состоит из четырех FR-доменов: FR1, FR2, FR3 и FR4. Таким образом, последовательности HVR и FR, как правило, имеют следующее расположение в VH (или VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Понятия "полноразмерное антитело", "интактное антитело" и "цельное антитело" в контексте настоящего описания используют взаимозаменяемо для обозначения антитела, имеющего структуру, практически сходную с нативной структурой антитела, или имеющего тяжелые цепи, которые содержат представленную в настоящем описании Fc-область.

Понятия «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» используют взаимозаменяемо, и они относятся к клеткам, в которые интродуцирована экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство указанных клеток. К клеткам-хозяевам относятся «трансформанты» и «трансформированные клетки», которые включают первично трансформированную клетку и полученное из нее потомство безотносительно к количеству пересевов. Потомство может не быть полностью идентичным по составу нуклеиновых кислот родительской клетке, а может содержать мутации. Под объем изобретения подпадает мутантное потомство, которое обладает такой же функцией или биологической активностью, которая обнаружена в результате скрининга или отобрана у исходной трансформированной клетки.

"Человеческое антитело" представляет собой антитело, имеющее аминокислотную последовательность, которая соответствует последовательности антитела, продуцируемого в организме человека или человеческой клеткой, или имеющего происхождение из нечеловеческого

источника, в котором использован спектр человеческих антител или другие кодирующие человеческое антитело последовательности. Из указанного определения человеческого антитела специально исключено гуманизированное антитело, содержащее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки.

5 "Человеческий консенсусный каркасный участок" представляет собой каркасный участок, в который входят наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в выбранных последовательностях каркасных участков VL или VH человеческого иммуноглобулина. Как правило, выбор последовательностей VL или VH человеческого иммуноглобулина осуществляют
10 из подгруппы последовательностей переменных доменов. Как правило, подгруппа последовательностей представляет собой подгруппу, описанную у Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., публикация NIH 91-3242, Bethesda MD, т.т. 1-3, 1991. В одном из вариантов осуществления изобретения касательно VL подгруппа представляет собой подгруппу каппа I
15 согласно Kabat и др., выше. В одном из вариантов осуществления изобретения касательно VH подгруппа представляет собой подгруппу III согласно Kabat и др., выше.

Понятие "гуманизированное" антитело относится к химерному антителу, которое содержит аминокислотные остатки из нечеловеческих HVR и
20 аминокислотные остатки из человеческих FR. В некоторых вариантах осуществления изобретения гуманизированное антитело может содержать практически все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или практически все HVR (например, CDR) соответствуют участкам нечеловеческого антитела, а все или практически все FR
25 соответствуют участкам человеческого антитела. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, имеющей происхождение из человеческого антитела. Понятие «гуманизированная форма» антитела, например, нечеловеческого антитела, относится к антителу, которое подвергли гуманизации.

30 Понятие «гипервариабельный участок» или «HVR» в контексте настоящего описания относится к каждому из участков переменного домена антитела, последовательности которых являются гипервариабельными («определяющие комплементарность участки» или «CDR») и/или формируют петли определенной

структуры («гипервариабельные петли»), и/или содержат контактирующие с антигеном остатки («контакты с антигеном»). Как правило, антитела содержат шесть HVR, т.е. содержит в целом шесть HVR, три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). Согласно настоящему описанию примеры HVR включают

5 (а) гипервариабельные петли, включающие аминокислотные остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) (Chothia и Lesk, J. Mol. Biol. 196, 1987, сс. 901-917);

(б) CDR, включающие аминокислотные остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) (Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National
10 Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991);

(в) области контакта с антигеном, включающие аминокислотные остатки 27с-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) и 93-101 (H3) (MacCallum и др., J. Mol. Biol. 262, 1996, сс. 732-745); и

15 (г) комбинации остатков, указанных в подпунктах (а), (б) и/или (в), включающие аминокислотные остатки HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) и 94-102 (H3).

Если специально не указано иное, то остатки в HVR и другие остатки в вариабельном домене (например, остатки в FR) нумеруют согласно Kabat и др.,
20 выше.

"Иммуноконъюгат" представляет собой антитело, конъюгированное с одной или несколькими гетерологичной(ыми) молекулой(ами), включая (но не ограничиваясь только им) цитотоксический агент.

«Индивидуум» или «субъект» представляет собой млекопитающее. К
25 млекопитающим относятся (но не ограничиваясь только ими) одомашненные животные (например, коровы, овцы, кошки, собаки и лошади), приматы (например, человек и приматы кроме человека, такие как обезьяны), кролики и грызуны (например, мыши и крысы). В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуум или субъект представляет собой человека.

30 "Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое отделено от компонента его естественного окружения. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело очищают до чистоты, превышающей 95% или 99% по данным, например, электрофоретических анализов (таких, например,

как ДСН-ПААГ, изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ), капиллярный электрофорез) или хроматографических анализов (таких, например, как ионообменная хроматография или ЖХВР с обращенной фазой). Обзор методов оценки чистоты антител см., например, у Flatman и др., J. Chrom. B 848, 2007, сс. 5 79-87.

"Выделенная" нуклеиновая кислота представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая отделена от компонента ее естественного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетке, которая в норме включает молекулу 10 нуклеиновой кислоты, но в которой молекула нуклеиновой кислоты присутствует вне хромосомы или в которой ее локализация на хромосоме отличается от ее встречающейся в естественных условиях локализации на хромосоме.

Понятие "выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против 15 C1s» или "выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против C1r» относится к одной или нескольким молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим тяжелые и легкие цепи антитела (или их фрагменты), включая указанную(ые) молекулу(ы) в одном векторе или в различных векторах, и 20 указанную(ые) молекулу(ы) нуклеиновой(ых) кислоты(т), присутствующую(ие) в одном или нескольких положениях в клетке-хозяине.

Понятие "моноклональное антитело" в контексте настоящего описания относится к антителу, полученному из популяции практически гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, входящие в популяцию, идентичны 25 и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением возможных вариантов антител, например, содержащих мутации, встречающиеся в естественных условиях или возникающие в процессе производства препарата моноклональных антител, указанные варианты, как правило, присутствуют в 30 минорных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые, как правило, включают различные антитела к различным детерминантам (эпитопам), каждое моноклональное антитело из препарата моноклонального антитела направлено против одной детерминаты антигена. Таким образом, прилагательное «моноклональный» определяет особенность антитела, характеризуя его как полученное из практически гомогенной

популяции антител, а не сконструированное в соответствии с требованиями к получению антитела с помощью какого-либо конкретного метода. Например, моноклональные антитела, которые можно применять согласно настоящему изобретению, можно создавать с помощью различных технологий, включая (но не ограничиваясь только ими) метод гибридом, методы рекомбинантной ДНК, методы фагового дисплея и методы, основанные на использовании трансгенных животных, которые содержат все или часть локусов человеческого иммуноглобулина, указанные методы и другие приведенные в качестве примера методы получения моноклональных антител представлены в настоящем описании.

Понятие «голое антитело» относится к антителу, неконъюгированному с гетерологичным фрагментом (например, цитотоксическим фрагментом) или радиоактивной меткой. Голое антитело может присутствовать в фармацевтической композиции.

Понятие "нативные антитела" относится к встречающимся в естественных условиях молекулам иммуноглобулинов, имеющим различные структуры. Например, нативные антитела в виде IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой примерно 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей, связанных дисульфидными мостиками. В направлении от N-конца к C-концу, каждая тяжелая цепь имеет переменную область (VH), которую называют также переменным тяжелым доменом или переменным доменом тяжелой цепи, за которой следует три константных домена (CH1, CH2 и CH3).

Аналогично этому, в направлении от N-конца к C-концу, каждая легкая цепь имеет переменную область (VL), которую называют также переменным легким доменом или переменным доменом легкой цепи, за которой следует константный домен легкой цепи (CL). Легкая цепь антитела в зависимости от аминокислотной последовательности ее константного домена может принадлежать к одному из двух типов, которые обозначают каппа и лямбда.

Понятие "листовка-вкладыш в упаковку" относится к инструкциям, которые обычно входят в поступающие в продажу упаковки терапевтических продуктов, содержащим информацию о показаниях, применении, дозе, пути введения,

комбинированной терапии, противопоказаниях и/или мерах предосторожности, которые связаны с применением указанных терапевтических продуктов.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" относительно полипептидной референс-последовательности определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в полипептидной референс-последовательности, после выравнивая последовательностей и при необходимости интродукции брешей для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и не рассматривая какие-либо консервативные замены в качестве компонента при оценке идентичности последовательностей. Сравнительный анализ для целей определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно осуществлять различными путями, известными в данной области, используя, например, публично доступные компьютерные программы, такие как программа BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR) или GENETYX® (фирма Genetyx Co., Ltd.). Специалисты в данной области могут определять соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

Авторство компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2 принадлежит фирме Genentech, Inc., и исходный код был представлен в комплекте с документацией для пользователей в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован как U.S. Copyright Registration № TXU510087. Программа ALIGN-2 публично доступна от фирмы Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, шт. Калифорния, или ее можно компилировать на основе исходного кода. Программу ALIGN-2 можно компилировать для применения в операционной системе UNIX, включая цифровую систему UNIX V4.0D. Все параметры, требуемые для сравнения последовательностей, устанавливаются программой ALIGN-2 и не должны изменяться.

В ситуациях, в которых ALIGN-2 применяют для сравнения аминокислотных последовательностей, % идентичности аминокислотной последовательности данной аминокислотной последовательности А по сравнению с данной аминокислотной последовательностью Б или относительно данной

аминокислотной последовательности Б (что в альтернативном варианте можно обозначать как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или содержит определенный % идентичности аминокислотной последовательности по сравнению с данной аминокислотной последовательностью Б или относительно данной аминокислотной последовательности Б), рассчитывают следующим образом:

$$100 \times \text{дробь } X/Y,$$

где X обозначает количество аминокислотных остатков, определенных как идентичные совпадения при оценке с помощью программы для сравнительного анализа последовательностей ALIGN-2, где с помощью программы осуществляли сравнение А и Б, и где Y обозначает общее количество аминокислотных остатков в Б. Должно быть очевидно, что, если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности Б, то % идентичности аминокислотной последовательности А относительно Б не может быть равен % идентичности аминокислотной последовательности Б относительно А. Если специально не указано иное, то все величины % идентичности аминокислотных последовательностей, указанные в настоящем описании, получали с использованием описанной в предыдущем параграфе компьютерной программы ALIGN-2.

Понятие "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой форме, что он обеспечивает биологическую активность входящего в его состав действующего вещества, которое должно обладать эффективностью, и который не содержит дополнительных компонентов, обладающих неприемлемой токсичностью для субъекта, которому следует вводить композицию.

"Фармацевтически приемлемый носитель" относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, отличному от действующего вещества, который является нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемые носители включают (но не ограничиваясь только ими) буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

В контексте настоящего описания фраза "специфически связывается с" относится к активности или характерной способности антитела связываться с не представляющим интерес антигеном с уровнем связывания, который включает

фоновое (т.е. неспецифическое) связывание, но не включает значительное (т.е. специфическое) связывание. Иными словами понятие "специфически связывается с" относится к активности или характерной способности антитела связываться с представляющим интерес антигеном с уровнем связывания, который включает значительное (т.е. специфическое) связывание в дополнение или вместо фонового (т.е. неспецифического) связывания. Специфичность можно измерять любыми методами, указанными в настоящей спецификации или известными в данной области. Указанный выше уровень неспецифического или фонового связывания может составлять ноль или может не составлять ноль, но быть близким у нулю, или может быть достаточно низким, чтобы специалисты в данной области могли им технически пренебрегать. Например, когда специалисту в данной области не удастся выявлять или обнаруживать какой-либо значительный (или относительно сильный) сигнал связывания между антителом и не представляющим интерес антигеном с помощью пригодного анализа связывания, то можно считать, что антитело "не связывается специфически с" не представляющим интерес антигеном. В противоположность этому, когда специалисту в данной области удастся выявлять или обнаруживать значительный (или относительно сильный) сигнал связывания между антителом и представляющим интерес антигеном с помощью пригодного анализа связывания, то можно считать, что антитело "связывается специфически с" представляющим интерес антигеном.

В контексте настоящего описания понятие "C1s" относится к любому нативному C1s из любого позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, человек) и грызуны (например, мыши и крысы), если специально не указано иное. Понятие включает "полноразмерный" непротессированный C1s, а также любую форму C1s, которая образуется в результате процессинга в клетке. Под понятие подпадают также встречающиеся в естественных условиях варианты C1s, например, сплайсинговые варианты или аллельные варианты. Приведенная в качестве примера аминокислотная последовательность человеческого C1s представлена в SEQ ID NO: 1. Приведенная в качестве примера аминокислотная последовательность C1s обезьян циномолгус представлена в SEQ ID NO: 3.

В контексте настоящего описания понятие "C1г" относится к любому нативному C1гиз любого позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, человек) и грызуны (например, мыши и крысы), если специально не указано иное. Понятие включает "полноразмерный" 5 непротессированный C1г, а также любую форму C1г, которая образуется в результате процессинга в клетке. Под понятие подпадают также встречающиеся в естественных условиях варианты C1г, например, сплайсинговые варианты или аллельные варианты. Приведенная в качестве примера аминокислотная последовательность человеческого C1г представлена в SEQ ID NO: 2. 10 Приведенная в качестве примера аминокислотная последовательность C1s обезьян циномоглус представлена в SEQ ID NO: 4.

В контексте настоящего описания понятие "лечение" (и его грамматические вариации, такие как "лечить" или "процесс лечения") относится к клиническому вмешательству с целью изменения естественного течения болезни у 15 индивидуума, подлежащего лечению, и его можно осуществлять либо для профилактики, либо в процессе развития клинической патологии. Требуемыми действиями лечения являются (но не ограничиваясь только ими) предупреждение возникновения или рецидива болезни, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий 20 болезни, предупреждение метастазов, снижение скорости развития болезни, облегчение или временное ослабление болезненного состояния и ремиссия или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, применяют для задержки развития болезни или замедления прогрессирования болезни.

25 Понятие "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) нативного антитела, как правило, имеют сходные структуры, при этом каждый домен содержит четыре консервативных каркасных участка (FR) и три гипервариабельных участка (HVR) (см., например, Kindt и др., Kuby Immunology, 6-ое изд., изд-во W.H. Freeman and Co., 2007, с. 91). 30 Одного VH- или VL-домена может быть достаточно для обеспечения специфичности связывания антигена. Кроме того, антитела, которые

связываются с конкретным антигеном, можно выделять, используя VH- или VL-домен из антитела, которое связывается с антигеном, для скрининга библиотеки комплементарных VL- или VH-доменов соответственно (см., например, Portolano и др., J. Immunol. 150, 1993, сс. 880-887; Clarkson и др., Nature 352, 1991, сс. 624-628).

Понятие "вектор" в контексте настоящего описания относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая обладает способностью к размножению другой нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Понятие включает вектор в виде самореплицирующейся структуры нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он интродуцирован. Некоторые векторы обладают способностью контролировать экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Указанные векторы в контексте настоящего описания обозначают как «экспрессионные векторы».

II. Антитело

Основой одного из объектов изобретения является, в частности, антитело, которое содержит антигенсвязывающую область и константную область антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложены антитела, которые связываются с C1s. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложены антитела, которые специфически связываются с C1s. Антитела, предлагаемые в изобретении, можно применять, например, для диагностики или лечения опосредуемого компонентом заболевания или нарушения.

В одном из вариантов осуществления изобретения виды C1s можно выбирать или одного или нескольких видов. В конкретных вариантах осуществления изобретения виды представляют собой человека и животное кроме человека. В конкретных вариантах осуществления изобретения к этим видам относятся человек, крысы и обезьяны (например, циномогус, макак резус, мармозетки, шимпанзе и бабуины). В конкретных вариантах осуществления изобретения к этим видам относятся человек и обезьяны (например, циномогус, макак резус, мармозетки, шимпанзе и бабуины) В конкретных вариантах осуществления изобретения к этим видам относятся человек и обезьяны циномогус.

Согласно вариантам осуществления изобретения антитела включают различные типы антител, включая фрагменты антител, химерные и гуманизированные антитела, человеческие антитела, полученные из библиотек антитела и мультиспецифические антитела. Согласно вариантам осуществления изобретения антитело может представлять собой полноразмерное антитело, например, интактное антитело IgG1-, IgG2-, IgG3- или IgG4-класса, или антитело другого класса или изотипа, указанного в настоящем описании.

Фрагменты антител

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, указанное в настоящем описании, представляет собой фрагмент антитела. Фрагменты антител включают (но не ограничиваясь только ими) такие фрагменты как Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv и scFv и другие описанные ниже фрагменты. Обзор некоторых фрагментов антител см., у Hudson и др., Nat. Med. 9, 2003, сс. 129-134. Обзор scFv-фрагментов см., например, у Plueckthun в: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, под ред. Rosenberg и Moore (изд-во Springer, New York), т. 113, 1994, сс. 269-315; см. также WO 93/16185; и патенты США №№ 5571894 и 5587458. Обсуждение, касающееся Fab- и F(ab')₂-фрагментов, которые содержат остатки эпитопа, связывающегося с рецептором спасения, и обладают удлинённым временем полужизни *in vivo*, см. патент США № 5869046.

Димерные антитела представляют собой фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими центрами, которые могут быть двухвалентными или биспецифическими (см., например, EP 0404097; WO 1993/01161; Hudson и др., Nat. Med. 9, 2003, сс. 129-134; и Holliger и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 6444-6448). Тримерные и тетрамерные антитела описаны также у Hudson и др., Nat. Med. 9, 2003, сс. 129-134.

Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие весь переменный домен тяжелой цепи или его часть, или весь переменный домен легкой цепи антитела или его часть. В некоторых вариантах осуществления изобретения однодоменное антитело представляет собой человеческое однодоменное антитело (фирма Domantis, Inc., Уолтхэм, шт. Массачусетс; см., например, патент США № 6248516 B1).

Фрагменты антител можно создавать с помощью различных методик, включая (но не ограничиваясь только ими) протеолитическое расщепление

интактного антитела, а также получать с помощью рекомбинантных клеток-хозяев (например, *E. coli* или фаг), указанных в настоящем описании.

Химерные и гуманизированные антитела

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, указанное в настоящем описании, представляет собой химерное антитело. Некоторые химерные антитела описаны, например, в патенте США № 4816567; и у Morrison и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1984, сс. 6851-6855. В одном из примеров химерное антитело содержит нечеловеческую переменную область (например, переменную область из антитела мышей, крыс, хомяков, кроликов или приматов кроме человека, таких как обезьяны) и человеческую константную область. В другом примере химерное антитело представляет собой антитело «переключенного класса», класс или подкласс которого был изменен относительно родительского антитела. Химерные антитела включают их антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления изобретения химерное антитело представляет собой гуманизированное антитело. Как правило, нечеловеческое антитело гуманизируют для снижения иммуногенности для людей, сохраняя при этом специфичность и аффинность родительского нечеловеческого антитела. Как правило, гуманизированное антитело содержит один или несколько переменных доменов, в которых HVR, например, CDR (или их участки), получают из нечеловеческого антитела, а FR (или их участки) получают из последовательностей человеческого антитела. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть человеческой константной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения некоторые остатки FR в гуманизированном антителе заменены на соответствующие остатки из нечеловеческого антитела (например, антитела, из которого имеют происхождение остатки HVR), например, для сохранения или улучшения специфичности или аффинности антитела.

Сведения о гуманизированных антителах и методах их создания обобщены, например, у Almagro, Front. Biosci. 13, 2008, сс. 1619-1633, и описаны также у Riechmann и др., Nature 332, 1988, сс. 323-329; Queen и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1989, сс. 10029-10033; в патентах США №№ 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; у Kashmiri и др., Methods 36, 2005, сс. 25-34 (описание

трансплантации определяющей специфичность области (SDR); Padlan, Mol. Immunol. 28, 1991, сс. 489-498 (описание «нанесения нового покрытия»); Dall'Acqua и др., Methods 36, 2005, сс. 43-60 (описание «перетасовки FR»); и Osbourn и др., Methods 36, 2005, сс. 61-68 и Klimka и др., Br. J. Cancer 83, 2000, сс. 252-260 (описание подхода «направленной селекции» для перестановки FR).

Человеческие каркасные участки, которые можно применять для гуманизации, включают (но не ограничиваясь только ими): каркасные участки, выбранные с использованием методов «наилучшего подбора» (см., например, Sims и др., J. Immunol. 151, 1993, сс. 2296-2308; каркасные участки, имеющие происхождение из консенсусной последовательности конкретной подгруппы переменных областей легких и тяжелых цепей человеческих антител (см., например, Carter и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1992, сс. 4285-4289 и Presta и др., J. Immunol. 151, 1993, сс. 2623-2632); человеческие зрелые (с соматическими мутациями) каркасные области или каркасные области человеческой зародышевой линии (см., например, Almagro и Fransson, Front. Biosci. 13, 2008, с. 1619-1633); и каркасные участки, полученные в результате скрининга библиотек FR (см., например, Vasa и др., J. Biol. Chem. 272, 1997, сс. 10678-10684 и Rosok и др., J. Biol. Chem. 271, 1996, сс. 22611-22618).

Человеческие антитела

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, указанное в настоящем описании, представляет собой человеческое антитело. Человеческие антитела можно получать, используя различные методики, известные в данной области. Человеческие антитела описаны в целом у van Dijk и van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5, 2001, сс. 368-374 и Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20, 2008, сс. 450-459.

Человеческие антитела можно получать путем введения иммуногена трансгенному животному, модифицированному таким образом, чтобы оно продуцировало интактные человеческие антитела или интактные антитела с человеческими переменными областями в ответ на контрольное заражение антигеном. Указанные животные, как правило, содержат все или часть локусов человеческого иммуноглобулина вместо эндогенных иммуноглобулиновых локусов, которые либо присутствуют вне хромосом, либо интегрированы произвольно в хромосомы животного. У таких трансгенных мышей эндогенные

иммуноглобулиновые локусы, как правило, инактивированы. Обзор методов получения человеческих антител в трансгенных животных см. у Lonberg, *Nat. Biotech.* 23, 2005, сс. 1117-1125 (см., например, также описание технологии XENOMOUSE® в патенте № 6075181 и патенте США № 6150584; описание технологии HUMAB® в патенте США № 5770429; описание технологии К-М MOUSE® в патенте США №7041870 и описание технологии VELOCIMOUSE® в публикации заявки на патент США 2007/0061900). Человеческие переменные области из интактных антител, полученных с помощью указанных животных, можно дополнительно модифицировать, например, путем объединения с другой человеческой константной областью.

Человеческие антитела можно создавать также с помощью методов на основе гибридом. Описаны клеточные линии человеческой миеломы и мышинной-человеческой гетеромиеломы, предназначенные для получения человеческих моноклональных антител (см., например, Kozbor, *J. Immunol.* 133, 1984, с. 3001; Brodeur и др., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, (изд-во Marcel Dekker, Inc., New York), 1987, сс. 51-63 и Voerner и др., *J. Immunol.* 147, 1991, сс. 86-95). Человеческие антитела, созданные с использованием технологии на основе человеческих В-клеточных гибридом, описаны также у Li и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 2006, сс. 3557-3562. Дополнительные методы включают методы, описанные, например, в патенте США № 7189826 (описание получения моноклональных человеческих антител IgM-типа из клеточных линий гибридом), и у Ni, *Xiandai Mianyixue* 26, 2006, сс. 265-268 (описание человеческих-человеческих гибридом). Технология человеческих гибридом (технология Trioma) описана также у Vollmers и Brandlein, *Histology and Histopathology* 20, 2005, сс. 927-937 и Vollmers и Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27, 2005, сс. 185-191.

Человеческие антитела можно создавать также путем выделения последовательностей переменных доменов Fv-клонов, выбранных из фаговых дисплейных библиотек, для создания которых использовали человеческие антитела. Указанные последовательности переменных доменов затем можно объединять с требуемым человеческим константным доменом. Методики отбора человеческих антител из библиотек антител описаны ниже.

Антитела, полученные из библиотек

Антитела, предлагаемые в изобретении, можно выделять путем скрининга комбинаторных библиотек антител с требуемой активностью или видами активности. Например, в данной области известны разнообразные методы для создания фаговых дисплейных библиотек и скрининга указанных библиотек в отношении антител, обладающих требуемыми характеристиками связывания. Указанные методы обобщены, например, у Hoogenboom и др. в: *Methods in Molecular Biology* 178, 2001, сс. 1-37(под ред. O'Brien и др., изд-во Human Press, Totowa, NJ), и описаны также, например, у McCafferty и др., *Nature* 348, 1990, сс. 552-554; Clackson и др., *Nature* 352, 1991, сс. 624-628; Marks и др., *J. Mol. Biol.* 222, 1992, сс. 581-597; Marks и Bradbury в: *Methods in Molecular Biology* 248, 2003, сс. 161-175 (под ред. Lo, изд-во Human Press, Totowa, NJ); Sidhu и др., *J. Mol. Biol.* 338, 2004, сс. 299-310; Lee и др., *J. Mol. Biol.* 340, 2004, сс. 1073-1093; Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2004, сс. 12467-12472 и Lee и др., *J. Immunol. Methods* 284, 2004, сс. 119-132.

При осуществлении некоторых методов фагового дисплея популяции VH- и VL-генов клонируют по отдельности с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и рекомбинируют произвольно в фаговых библиотеках, которые затем подвергают скринингу в отношении антигенсвязывающего фага согласно методу, описанному у Winter и др., *Ann. Rev. Immunol.* 12, 1994, сс. 433-455. Фаг, как правило, экспонирует фрагменты антител либо в виде одноцепочечных Fv-фрагментов (scFv), либо в виде Fab-фрагментов. Библиотеки, полученные из иммунизированных источников, включают антитела, обладающие высокой аффинностью к иммуногену, при этом отсутствует необходимость в создании гибридом. Альтернативно этому, можно клонировать необработанную («наивную») популяцию (например, из организма человека), получая один источник антител к широкому спектру чужих, а также своих антигенов без какой-либо иммунизации, что описано у Griffiths и др., *EMBO J.* 12, 1993, сс. 725-734. И, наконец, «наивные» библиотеки можно получать также методами синтеза путем клонирования неперегруппированных сегментов V-гена из стволовых клеток и с помощью ПЦР-праймеров, содержащих случайную последовательность, для кодирования гипервариабельных CDR3-участков и для осуществления перегруппировки *in vitro* согласно методу, описанному у

Hoogenboom и Winter, J. Mol. Biol. 227, 1992, сс. 381-388. Фаговые библиотеки человеческих антител описаны, например, в следующих патентных публикациях: в патенте США № 5750373 и публикациях заявок на патент США 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 5 2007/0292936 и 2009/0002360.

Антитела или фрагменты антител, выделенные из библиотек человеческих антител, рассматриваются как человеческие антитела или фрагменты человеческих антител.

Мультиспецифические антитела

10 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, указанное в настоящем описании, представляет собой мультиспецифическое антитело, например, биспецифическое антитело. Мультиспецифические антитела представляют собой моноклональные антитела, которые имеют специфичности, связывающиеся по меньшей мере с двумя различными сайтами. В некоторых 15 вариантах осуществления изобретения одна из связывающих специфичностей обеспечивает связывание с C1s, а другая с любым другим антигеном. В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифические антитела могут связываться с двумя различными эпитопами C1s. Биспецифические антитела можно применять также для локализации цитотоксических агентов в 20 клетках, которые экспрессируют C1s. Биспецифические антитела можно получать в виде полноразмерных антител или фрагментов антител.

Методики создания мультиспецифических антител включают (но не ограничиваясь только ими) рекомбинантную совместную экспрессию двух пар тяжелых цепей-легких цепей иммуноглобулинов, обладающих различными 25 специфичностями (см. Milstein и Cuello, Nature 305, 1983, сс. 537-540, WO 93/08829 и Traunecker и др., EMBO J. 10, 1991, сс. 3655-3659), и технологию «knob-in-hole» (обеспечение взаимодействия по типу «выступ-во впадину», см., например, патент США № 5731168). Мультиспецифические антитела можно получать также путем создания регулируемых электростатических воздействий 30 для получения молекул антитела с гетеродимерными Fc (WO 2009/089004); перекрестного связывания двух или большего количества антител или фрагментов (см., например, патент США № 4676980 и Brennan и др., Science 229, 1985, с. 81); применения лейциновых молний для получения биспецифических

антител (см., например, Kostelny и др., J. Immunol. 148, 1992, сс. 1547-1553);
применения технологии «димерных антител» для создания фрагментов
биспецифических антител (см., например, Holliger и др., Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 90, 1993, сс. 6444-6448); и применения димеров одноцепочечных Fv (sFv)
5 (см., например, Gruber и др., J. Immunol. 152, 1994, с. 5368); и получения
триспецифических антител согласно методу, описанному, например, у Tutt и др.,
J. Immunol. 147, 1991, с. 60).

Под объем настоящего изобретения подпадают также сконструированные
антитела с тремя или большим количеством функциональных
10 антигенсвязывающих сайтов, включая «антитела-осьминоги» (см., например, US
2006/0025576A1).

Антитело или его фрагмент, указанное/указанный в настоящем описании,
включает также «Fab двойного действия» или «DAF», содержащий
антигенсвязывающий сайт, который связывается с C1s, а также с другим,
15 отличным от него антигеном (см., например, US 2008/0069820).

А. Выделенное антитело

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет
собой выделенное антитело. В конкретном варианте осуществления изобретения
выделенное антитело содержит антигенсвязывающую область и константную
20 область антитела.

В конкретном варианте осуществления изобретения выделенное антитело
может обладать функцией вытеснения, состоящей в том, что антитело
специфически связывается с C1s и способствует диссоциации C1q из комплекса
C1qrs. В конкретном варианте осуществления изобретения выделенное антитело
25 может обладать блокирующей функцией, состоящей в том, что антитело
специфически связывается с C1s и ингибирует связывание C1q с C1r2s2.
Выделенное антитело может обладать либо одной из указанных функций, либо
может обладать и функцией вытеснения, и блокирующей функцией.
Предпочтительно антитело обладает обеими функциями.

30 В одном из вариантов осуществления изобретения выделенное антитело
специфически связывается с C1s рН-зависимым образом. В качестве
конкретного примера указанного варианта осуществления изобретения в случае,

когда связывающую активность антитела с C1s человека и/или обезьян
циномолгус измеряют с помощью поверхностного плазмонного резонанса, то

I) величину константы диссоциации (KD) в диапазоне нейтральных
значений pH удастся надежно рассчитывать, а величину KD в диапазоне кислых
5 значений pH не удастся надежно рассчитывать из-за отсутствия связывающей
активности или весьма низкой связывающей активности, или

II) соотношение величины KD в диапазоне кислых значений pH и величины
KD в диапазоне нейтральных значений pH, т.е. соотношение KD в кислой среде/
KD в нейтральной среде, составляет более 10, при условии, что величины KD и в
10 диапазоне нейтральных значений pH, и в диапазоне кислых значений pH удастся
надежно рассчитывать.

Следует ожидать, что такие антитела могут обладать высокой
эффективностью в качестве фармацевтических средств, поскольку можно
снижать их дозу и частоту введения пациентам и, как следствие, можно снижать
15 общую дозу. Следует ожидать, что антитела против C1s могут обладать
улучшенным профилем безопасности по сравнению с антителами, которые
связываются и удаляют комплексы C1qrs из плазмы, поскольку они должны
удалять из плазмы только C1r2s2 (посредством связывания с C1s), но не удалять
C1q из плазмы. В результате можно избегать побочных действий, связанных с
20 истощением C1q. Кроме того, следует ожидать, что антитела, быстро
вытесняющие C1q, должны обладать более быстрой нейтрализацией активности
комплемента, что может приводить к более быстрому началу проявления
эффективности лечения.

(a1) BIACORE®-анализ/концепция вытеснения

25 В одном из вариантов осуществления изобретения выделенное антитело,
которое ингибирует взаимодействие между C1q и комплексом C1r2s2,
представляет собой антитело, связывающееся с комплексом C1qrs на чипе,
применяемом для анализа методом поверхностного плазмонного резонанса,
например, BIACORE®-чипе, и способствует диссоциации C1q из комплекса
30 C1qrs. В некоторых вариантах осуществления изобретения упомянутую выше
функцию связывания с комплексом C1qrs и способствующую диссоциации C1q
из комплекса C1qrs в настоящем описании обозначают как "функция/активность
вытеснения" или "функция/активность вытеснения C1q". Функцию/активность

можно соответствующим образом оценивать качественно или количественно с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE®-анализа, указанного в настоящем описании. В других вариантах осуществления изобретения антитело можно рассматривать как антитело, обладающее функцией вытеснения, когда количество единиц ответа (RU) в присутствии антитела ниже, чем количество единиц ответа (RU) в отсутствии антитела при определении методом поверхностного плазмонного резонанса, например, с помощью BIACORE®-анализа, при оценке по истечении достаточного периода времени. На сенсограмме, полученной в результате такого анализа, можно идентифицировать, что кривая, полученная в присутствии C1q и антитела, приближается к кривой, полученной в присутствии C1q в отсутствие антитела. В других вариантах осуществления изобретения можно идентифицировать "момент времени пересечения", когда кривая, полученная в присутствии C1q в отсутствие антитела, пересекает кривую, полученную в присутствии C1q и антитела (см. подробности в разделе "Примеры"). Строго говоря, даже на одной сенсограмме может быть обнаружено несколько моментов времени пересечения из-за шума или колебаний последней указанной кривой при пересечении первой кривой. В таком случае любой из нескольких моментов времени пересечения можно выбирать в качестве "момента времени пересечения". Фраза "по истечении достаточного периода времени" означает, что промежуток времени от "момента времени пересечения" до момента времени измерения количества единиц ответа (RU) является достаточным для измерения. В некоторых вариантах осуществления изобретения момент времени измерения количества единиц ответа (RU) составляет по меньшей мере 60 с, 100 с, 150 с, 200 с, 500 с, 700 с, 1000 с, 1500 с или 2000 от момента времени начала инъекции антитела. Альтернативно этому, момент времени измерения может составлять по меньшей мере 100 с, 200 с, 300 с, 400 с, 500 с, 600 с, 700 с, 800 с, 900 с, 1000 с, 3000 с, 5000 с, 7000 с или 10000 с от момента времени пересечения.

В одном из вариантов осуществления изобретения выделенное антитело, которое ингибирует взаимодействие между C1q и комплексом C1r2s2, можно рассматривать как антитело, обладающее функцией вытеснения, когда момент времени пересечения (например, при оценке с помощью BIACORE®-анализа) находится в пределах 60 с, 100 с, 150 с, 200 с, 500 с, 700 с, 1000 с, 1500 с или

2000 с от момента времени начала инъекции антитела, при определении с помощью, например, BIACORE®-анализа с использованием следующих условий: уровни захвата комплекса C1r2s2 и C1q соответствуют 200 резонансным единицам (RU) и 200 резонансным единицам (RU) соответственно, и антитело
5 инъецируют в качестве аналита в концентрации 500нМ со скоростью 10 микролитров (мкл)/мин.

В одном из вариантов осуществления изобретения выделенное антитело, которое ингибирует взаимодействие между C1q и комплексом C1r2s2, можно рассматривать как антитело, обладающее функцией вытеснения, когда
10 диссоциация практически всего (или всего) C1q из комплекса C1qrs происходит в пределах 100 с, 300 с, 500 с, 700 с, 1000 с, 1500 с, 2000 с, 3000 с, 5000 с, 7000 с или 10000 с от момента времени начала инъекции антитела при определении с помощью например, BIACORE®-анализа, с использованием следующих условий: уровни захвата комплекса C1r2s2 и C1q соответствуют 200 резонансным
15 единицам (RU) и 200 резонансным единицам (RU) соответственно, и антитело инъецируют в качестве аналита в концентрации 500нМ со скоростью 10 мкл/мин. Например, на сенсограмме, полученной в результате указанного анализа, можно определять, что "диссоциация практически всего (или всего) C1q из комплекса C1qrs" происходит, когда значение (RU) в присутствии C1q и
20 антитела приближается к значению (RU) или достигает его в присутствии антитела в отсутствие C1q. В контексте настоящего описания понятие "практически весь (C1q)" относится к проценту, составляющему 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более; и
25 понятие "весь (C1q)" относится к проценту, составляющему 100%. Процент диссоциации C1q можно определять количественно с помощью любого анализа, представленного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ скрининга антитела, которое вытесняет C1q из комплекса C1r2s2, с использованием описанного выше метода измерения "функции/активности вытеснения" такого антитела. В одном из
30 вариантов осуществления изобретения способ скрининга включает выбор антитела, которое ингибирует взаимодействие между C1q и комплексом C1r2s2; т.е. выбор антитела, которое связывается с комплексом C1qrs и способствует

диссоциации C1q из комплекса C1qr. Антитело, обладающее функцией/активностью вытеснения, можно соответствующим образом выбирать с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE®-анализа, указанного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ скрининга включает определение (I) количества единиц ответа (RU) в присутствии антитела и (II) количества единиц ответа (RU) в отсутствии антитела с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE®-анализа, при оценке по истечении достаточного периода времени. Способ скрининга может включать сравнение значения, указанного выше в подпункте (I), и значения, указанного выше в подпункте (II). Способ скрининга может включать выбор антитела, если значение, указанное выше в подпункте (I), ниже, чем значение в указанном выше подпункте (II). Способ скрининга может включать идентификацию "момента времени пересечения", в который кривая, полученная в присутствии C1q и отсутствии антитела, пересекает кривую, полученную в присутствии C1q и антитела. Как отмечалось выше, даже на одной сенсограмме может быть обнаружено несколько моментов времени пересечения, любой из нескольких моментов времени пересечения можно выбирать в качестве "момента времени пересечения". В некоторых вариантах осуществления способ скрининга может включать определение количества единиц ответа (RU) по меньшей мере через 60 с, 100 с, 150 с, 200 с, 500 с, 700 с, 1000 с, 1500 с или 2000 с после момента времени начала инъекции антитела. Альтернативно этому, способ скрининга может включать определение количества единиц ответа (RU) по меньшей мере через 100 с, 200 с, 300 с, 400 с, 500 с, 600 с, 700 с, 800 с, 900 с, 1000 с, 3000 с, 5000 с, 7000 с или 10000 с после момента времени пересечения. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ скрининга может включать выбор антитела, которое ингибирует взаимодействие между C1q и комплексом C1r2s2, или антитела, обладающего функцией вытеснения, если момент времени пересечения находится в пределах 60 с, 100 с, 150 с, 200 с, 500 с, 700 с, 1000 с, 1500 с или 2000 с от момента времени начала инъекции антитела, при определении, например, с помощью BIACORE®-анализа с использованием следующих условий: уровни захвата комплекса C1r2s2 и C1q соответствуют 200 резонансным единицам (RU) и 200 резонансным единицам (RU) соответственно,

и антитело инъецируют в качестве аналита в концентрации 500нМ со скоростью 10 микролитров (мкл)/мин. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ скрининга может включать выбор антитела, которое ингибирует взаимодействие между C1q и комплексом C1r2s2, или антитела, обладающего функцией вытеснения, если диссоциация практически всего (или всего) C1q из комплекса C1qrs происходит в пределах 100 с, 300 с, 500 с, 700 с, 1000 с, 1500 с, 2000 с, 3000 с, 5000 с, 7000 с или 10000 с от момента времени начала инъекции антитела при определении с помощью, например, BIACORE®-анализа с использованием следующих условий: уровни захвата комплекса C1r2s2 и C1q соответствуют 200 резонансным единицам (RU) и 200 резонансным единицам (RU) соответственно, и антитело инъецируют в качестве аналита в концентрации 500нМ со скоростью 10 мкл/мин. Как указано выше, понятие "практически весь (C1q)" относится к проценту, составляющему 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более; и понятие "весь (C1q)" относится к проценту, составляющему 100%, и процент диссоциации C1q можно определять количественно с помощью любого анализа, указанного в настоящем описании, включая BIACORE®-анализ.

(a2) BIACORE®-анализ/концепция блокирования

Одним из вариантов осуществления изобретения является выделенные антитела, которые ингибируют взаимодействие между C1q и комплексом C1r2s2, где антитело обладает блокирующей функцией, состоящей в том, что антитело связывается с C1r2s2 и ингибирует связывание C1q с C1r2s2. В другом варианте осуществления изобретения антитело имеет коэффициент блокирования, составляющий по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более. Блокирующую функцию/активность или коэффициент блокирования можно определять с помощью BIACORE®-анализа. Для оценки уровня блокирования C1q можно использовать следующие условия: уровни захвата C1r2s2 соответствуют 50, 100, 200, 400 резонансным единицам (RU). Варианты антител инъецируют в концентрации 250, 500, 1000, 2000нМ для насыщения связывания антитела, после чего инъецируют человеческий C1q в концентрации 50, 100, 200нМ в сочетании с вариантами антител в концентрации 250, 500, 1000, 2000нМ или без антител. Коэффициент блокирования рассчитывают с помощью

следующей формулы: [1- (ответ в виде связывания человеческого С1q в присутствии варианта антитела / ответ в виде связывания человеческого С1q в отсутствии варианта антитела)] × 100%.

(а3) Зависимость от рН

5 В одном из вариантов осуществления изобретения выделенное антитело специфически связывается с С1s рН-зависимым образом. В предпочтительном варианте осуществления изобретения связывающая активность антитела с С1s ниже в диапазоне кислых значений рН (например, при рН 6,0), чем в диапазоне нейтральных значений рН (например, при рН 7,4).

10 В одном из вариантов осуществления изобретения можно считать, что антитело обладает значительно более низким связыванием с С1s в диапазоне кислых значений рН, если после измерения связывающей активности методом поверхностного плазмонного резонанса и вычисления по полученным данным величины константы диссоциации (KD), установлено, что величина KD в
15 диапазоне кислых значений рН определена меньшей надежностью или активность связывания с С1s в диапазоне кислых значений рН не поддается обнаружению; это означает, что в случае, когда связывающую активность антитела с С1s человека и/или обезьян циномоглус измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса, то

20 I) величину KD в диапазоне нейтральных значений рН удается надежно рассчитывать, а величину KD в диапазоне кислых значений рН не удается надежно рассчитывать из-за отсутствия связывающей активности или весьма низкой связывающей активности, или

II) соотношение величины KD в диапазоне кислых значений рН и величины
25 KD в диапазоне нейтральных значений рН, т.е. соотношение KD в кислой среде/KD в нейтральной среде, составляет более 10, при условии, что величины KD и в диапазоне нейтральных значений рН, и в диапазоне кислых значений рН удается надежно рассчитывать.

30 В одном из вариантов осуществления изобретения соотношение KD в кислой среде/KD в нейтральной среде, указанное в подпункте II), предпочтительно составляет 14 или выше, 44 или выше, 45 или выше, 72 или выше, 99 или выше, 100 или выше, 107 или выше, 110 или выше, 117 или выше, 120 или выше, 138 или выше, 181 или выше, 209 или выше, 225 или выше, 278

или выше. В одном из вариантов осуществления изобретения соотношение KD в кислой среде/ KD в нейтральной среде, указанное в подпункте II), более предпочтительно составляет 44 или выше, 45 или выше, 72 или выше, 99 или выше, 100 или выше, 107 или выше, 110 или выше, 117 или выше, 120 или выше, 138 или выше, 181 или выше, 209 или выше, 225 или выше, 278 или выше.

Значение применяемого в этом случае понятия "надежно" объяснено ниже в настоящем описании. Величину KD каждого образца при pH 7,4 и pH 6,0 определяли при 37°C, используя устройство T200 для BIACORE® (фирма Cytiva). Очищенную легкую каппа-цепь мышинового античеловеческого Ig (фирма GE Healthcare) можно иммобилизовывать на всех проточных ячейках сенсорного чипа CM5 с помощью набора для аминного сочетания (фирма GE Healthcare). В качестве подвижного буфера применяли буфер, включающий 20мМ ACES, 150мМ NaCl, 1,2мМ CaCl₂, 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА) (свободного от IgG), 1 мг/мл CMD (натриевая соль CM-декстрана), 0,05% Tween® 20 и 0,005% NaN₃ (pH 7,4 или pH 6,0). Каждое антитело могло захватываться на сенсорной поверхности через легкую каппа-цепь античеловеческого Ig. Уровни захвата антитела доводили до уровней, соответствующих 50 резонансным единицам (RU). Для определения величины KD при pH 7,4 комплекс человеческого C1r2s2 приготавливали таким образом, чтобы белковый комплекс можно было инъецировать в концентрации 0, 25, 40, 100, 200, 400нМ, 0, 12,5, 25, 40, 100, 200нМ или 0, 6,3, 12,5, 25, 50, 100нМ со скоростью 30 мкл /мин. Для определения величины KD при pH 6,0, комплекс C1r2s2 человека или обезьян циномоглус (супо) приготавливали таким образом, чтобы белковый комплекс можно было инъецировать в концентрации 0, 200, 400, 800, 1600, 3200нМ или 0, 50, 100, 200, 400, 800нМ со скоростью 30 мкл/мин, например, с глицином, pH 2,0 (фирма GE Healthcare). Сенсорную поверхность регенерировали после каждого цикла с помощью, например, глицина, pH 2,0 (фирма GE Healthcare). Величины KD определяли с помощью оценочного программного обеспечения BIACORE® T200, версия 2.0 (фирма Cytiva).

Величины KD при pH 6,0 сравнивали с величинами KD при pH 7,4 (соотношение KD в кислой среде/ KD в нейтральной среде). Если по результатам контроля качества программного обеспечения BIACORE® указано, что "кинетические

константы не могут быть определены однозначно" для антитела, то считали, что величину KD для антитела не удастся надежно рассчитать.

В одном из вариантов осуществления изобретения связывающую активность измеряли с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C с использованием сенсорного чипа, на котором каждое антитело иммобилизовывали с помощью легкой каппа-цепи человеческого Ig с уровнем захвата, соответствующим 50 резонансным единицам, и с использованием подвижного буфера, содержащего 20мМ ACES (N-(2-ацетамидо)-2-аминоэтансульфоновая кислота), 150мМ NaCl, 1,2мМ CaCl₂, 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА), 1 мг/мл натриевой соли CM-декстрана (CMD), 0,05% полисорбата 20, 0,005% NaN₃.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитела не включали антитела, величину KD которых в диапазоне нейтральных значений pH не удавалось надежно рассчитывать из-за отсутствия связывающей активности или весьма низкой связывающей активности.

Помимо связывания с C1s pH-зависимым образом, другим важным свойством может являться воздействие кальция на pH-зависимую аффинность антитела к C1s. C1s образует димеры при высоких концентрациях кальция, но при низких концентрациях кальция происходит их диссоциация на мономеры. Когда C1s находится в димерном состоянии, двухвалентное антитело может образовывать иммунные комплексы путем перекрестного сшивания нескольких молекул C1s. Это позволяет антителу связываться с молекулами C1s внутри комплекса путем взаимодействий, основанных как на аффинности, так и на авидности, что повышает тем самым кажущуюся аффинность антитела. В противоположность этому, когда C1s находится в мономерном состоянии, антитело связывается с C1s только посредством основанного на аффинности взаимодействия. Это означает, что pH-зависимое антитело против C1s может образовывать иммунный комплекс с димерным C1s в плазме, но оказавшись внутри кислой эндосомы C1s будет диссоциировать на мономеры. Это приводит к распаду иммунного комплекса, который затем усиливает pH-зависимую диссоциацию антитела от антигена.

Согласно одному из объектов изобретения для выделенного антитела против C1s соотношение величины KD, характеризующей его C1s-связывающую

активность при кислом значении рН, и величины KD, характеризующей его C1s-связывающую активность при нейтральном значении рН ($KD(\text{кислое значение рН})/KD(\text{нейтральное значение рН})$), составляет более 10 при измерении при высокой концентрации кальция, как при нейтральном, так и при кислом значении рН. Согласно одному из объектов изобретения для выделенного антитела против C1s соотношение величины KD, характеризующей его C1s-связывающую активность при кислом значении рН, и величины KD, характеризующей его C1s-связывающую активность при нейтральном значении рН ($KD(\text{кислое значение рН})/KD(\text{нейтральное значение рН})$), составляет более 10 при измерении при высокой концентрации кальция при нейтральном рН и при низкой концентрации кальция при кислом рН. В некоторых вариантах осуществления изобретения для выделенного антитела против C1s соотношение величины KD, характеризующей его C1s-связывающую активность при кислом значении рН, и величины KD, характеризующей его C1s-связывающую активность при нейтральном значении рН ($KD(\text{кислое значение рН})/KD(\text{нейтральное значение рН})$), составляет более 10 при измерении при низкой концентрации кальция как при нейтральном, так и при кислом значении рН, когда антитело против C1s связывается с C1s, находящимся в димерном состоянии.

Не вдаваясь в конкретную теорию, в случае, когда 1) структура эпитопа C1s, связанного с антителом, может быть конформационно изменена из-за отсутствия кальция, что приводит к изменению аффинности антитела, или 2) взаимодействие (аффинность или avidность) антитела могут варьироваться в зависимости от состояния C1s (мономерное состояние или димерное состояние), измерение с использованием специфических условий (при высокой концентрации кальция при нейтральном рН и при низкой концентрации кальция при кислом рН) можно применять для оценки соотношения величин KD ($KD(\text{кислое значение рН})/KD(\text{нейтральное значение рН})$).

Иными словами, антитело связывается с C1s с более высокой аффинностью при нейтральном рН, чем при кислом рН, что описано ниже в подпунктах (I) или (II):

(I) при измерении при высокой концентрации кальция и при нейтральном, и при кислом значении рН соотношение величины KD, характеризующей его C1s-

связывающую активность при кислом значении рН, и величины KD, характеризующей его C1s-связывающую активность при нейтральном значении рН ($KD(\text{кислое значение рН})/KD(\text{нейтральное значение рН})$), составляет более 10,

5 (II) при измерении при высокой концентрации кальция при нейтральном рН и при низкой концентрации кальция при кислом рН, соотношение величины KD, характеризующей его C1s-связывающую активность при кислом значении рН, и величины KD, характеризующей его C1s-связывающую активность при нейтральном значении рН ($KD(\text{кислое значение рН})/KD(\text{нейтральное значение рН})$), составляет более 10.

10 Более конкретно, не вдаваясь в конкретную теорию, в случае, когда 1) структура эпитопа конкретного антигена, связанного с антителом, может быть конформационно изменена из-за отсутствия кальция, что приводит к изменению аффинности антитела, или 2) взаимодействие (аффинность или авидность) антитела могут варьироваться в зависимости от состояния антигена (мономерное состояние или димерное состояние), измерение с использованием специфических условий (при высокой концентрации кальция при нейтральном рН и при низкой концентрации кальция при кислом рН) можно применять для оценки соотношения величин KD ($KD(\text{кислое значение рН})/KD(\text{нейтральное значение рН})$).

20 Таким образом, тот факт, что антитело связывается с антигеном с более высокой аффинностью при нейтральном рН, чем при кислом рН, следует из того, что: при измерении при высокой концентрации кальция при нейтральном рН и при низкой концентрации кальция при кислом рН, соотношение величины KD, характеризующей его связывающую активность в отношении антитела при кислом значении рН, и величины KD, характеризующей его связывающую активность в отношении антигена при нейтральном значении рН ($KD(\text{кислое значение рН})/KD(\text{нейтральное значение рН})$), составляет более 10.

25 Вышеуказанное соотношение KD, т.е. $KD(\text{кислое значение рН})/KD(\text{нейтральное значение рН})$ можно сравнивать между родительским антителом (т.е. исходным антителом до модификации, предлагаемой в настоящем изобретении) и антителом, в которое интродуцирована(ы) одна или

несколько аминокислотных мутаций (например, добавления, инсерции, делеции или замена) относительно исходного (родительского) антитела.

Исходное (родительское) антитело может представлять собой любое известное или новое выделенное антитело, если оно специфически связывается с C1s. Так, в одном из объектов изобретения для выделенного антитела против C1s соотношение величины KD, характеризующей его C1s-связывающую активность при кислом значении pH, и величины KD, характеризующей его C1s-связывающую активность при нейтральном значении pH ($KD(\text{кислое значение pH})/KD(\text{нейтральное значение pH})$), по меньшей мере в 1,2 раза, 1,4 раза, 1,6
10 раза, 1,8 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 5 раз, 8 раз, 10 раз выше, чем соотношение величины KD, характеризующей его C1s-связывающую активность при кислом значении pH, и величины KD, характеризующей его C1s-связывающую активность при нейтральном значении pH ($KD(\text{кислое значение pH})/KD(\text{нейтральное значение pH})$) исходного (родительского) антитела. Иными
15 словами, в настоящем изобретении предложено выделенное антитело против C1s, где в выделенное антитело против C1s интродуцирована(ы) одна или несколько аминокислотных мутаций (например, добавления, инсерции, делеции или замена) относительно исходного (родительского) антитела, и соотношение (I) и (II) ниже по меньшей мере в 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 8 или 10 раз:
20 где (I) соотношение величины KD, характеризующей его C1s-связывающую активность при кислом значении pH, и величины KD, характеризующей его C1s-связывающую активность при нейтральном значении pH ($KD(\text{кислое значение pH})/KD(\text{нейтральное значение pH})$) выделенного антитела против C1s; (II) соотношение величины KD, характеризующей его C1s-связывающую активность
25 при кислом значении pH, и величины KD, характеризующей его C1s-связывающую активность при нейтральном значении pH ($KD(\text{кислое значение pH})/KD(\text{нейтральное значение pH})$) родительского (исходного) антитела. Указанные соотношения KD можно измерять при любой (высокой или низкой) концентрации кальция, например, измерять при высокой концентрации кальция как при нейтральном, так и при кислом pH, или измерять при высокой
30 концентрации кальция при нейтральном pH и при низкой концентрации кальция при кислом pH.

Согласно одному из объектов изобретения антитела обладают антигенсвязывающей активностью, которая является различной во внутриклеточных условиях и внеклеточных условиях. Понятие "внутриклеточные и внеклеточные условия" относится к условиям, которые являются различными внутри и вне клетки. Категории условий включают, например, концентрацию ионов, более конкретно, концентрацию ионов металлов, концентрацию ионов водорода (рН) и концентрацию ионов кальция. Понятие "внутриклеточные условия" предпочтительно относится к характеристикам среды внутри эндосомы, в понятие "внеклеточные условия" относится к характеристикам среды в плазме. Антитела, особенностью которых является наличие антигенсвязывающей активности, которая изменяется в зависимости от концентрации ионов, можно получать путем скрининга большого количества антител в отношении доменов, обладающих указанным свойством. Например, антитела с указанным выше свойством можно получать путем создания большого количества антител, последовательности которых отличаются друг от друга, методом гибридом или путем создания библиотек антител, и измерения их антигенсвязывающей активности при различных концентрациях ионов. Метод клонирования В-клеток является одним из примеров методов скрининга указанных антител. Кроме того, как будет описано ниже, определяют по меньшей мере один характерный аминокислотный остаток, который может наделять антитело способностью обладать антигенсвязывающей активностью, которая изменяется в зависимости от концентрации ионов, для получения библиотеки из большого количества антител, которые имеют различные последовательности, но при этом имеют характерные аминокислотные остатки в качестве общей структурой особенности. Такую библиотеку можно подвергать скринингу в отношении эффективного выделения антител, обладающих указанным выше свойством.

Одним из объектов изобретения является антитело, которое связывается с С1s с более высокой аффинностью при нейтральном значении рН, чем при кислом значении рН. Другим объектом изобретения являются антитела против С1s, для которых характерно рН-зависимое связывание с С1s. В контексте настоящего описания выражение "рН-зависимое связывание" означает "пониженное связывание при кислом значении рН по сравнению с нейтральным

значением рН", и оба эти выражения можно использовать взаимозаменяемо.

Например, антитела против С1s, "характеризующиеся рН-зависимым связыванием", включают антитела, которые связываются с С1s с более высокой аффинностью при нейтральном значении рН, чем при кислом значении рН.

5 В конкретном варианте осуществления изобретения соотношение величины КD, характеризующей С1s-связывающую активность при кислом значении рН, и величины КD, характеризующей С1s-связывающую активность при нейтральном значении рН ($KD(\text{кислое значение рН})/KD(\text{нейтральное значение рН})$), составляет более 10 при измерении при высокой концентрации кальция как при
10 нейтральном, так и при кислом значении рН. В конкретных вариантах осуществления изобретения антитела связываются с С1s с аффинностью, по меньшей мере в 11, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 раз или более высокой при нейтральном значении рН, чем при кислом значении рН.

15 В конкретном варианте осуществления изобретения соотношение величины КD, характеризующей С1s-связывающую активность при кислом значении рН, и величины КD, характеризующей С1s-связывающую активность при нейтральном значении рН ($KD(\text{кислое значение рН})/KD(\text{нейтральное значение рН})$), составляет более 10 при измерении при высокой концентрации кальция при
20 нейтральном значении рН и при низкой концентрации кальция при кислом значении рН. В конкретных вариантах осуществления изобретения антитела связываются с С1s с аффинностью, по меньшей мере в 11, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 раз или более высокой при нейтральном значении рН, чем при кислом значении рН.

25 В указанных выше вариантах, например, кислое значение составляет рН 6,0, а нейтральное значение рН составляет 7,4, т.е. $KD(\text{кислое значение рН})/KD(\text{нейтральное значение рН})$ составляет $KD(\text{рН } 6,0)/KD(\text{рН } 7,4)$. Связанные с указанным примерами кислых значений рН и нейтральных значений рН более подробно представлены ниже в настоящем описании. В некоторых
30 вариантах осуществления изобретения $KD(\text{кислое значение рН})/KD(\text{нейтральное значение рН})$, такое как $KD(\text{рН } 6,0)/KD(\text{рН } 7,4)$, может составлять от 11 до 10000.

Когда антиген представляет собой растворимый белок, то связывание антитела с антигеном может приводить к удлинению времени полужизни антигена в плазме (т.е. снижению клиренсу антигена из плазмы), поскольку антитело может иметь более длительное время полужизни в плазме по сравнению со свободным антигеном и может служить в качестве носителя для антигена. Это является результатом рециклинга комплекса антиген-антитело с помощью FcRn через эндосомальный путь в клетке (Roopenian и Akilesh, *Nat Rev Immunol* 7(9), 2007, сс. 715-725). Однако для антитела с pH-зависимыми характеристиками связывания, которое связывается с его антигеном в нейтральной внеклеточной среде, ожидается, что при высвобождении антигена в кислые эндосомальные компартменты после его попадания в клетки, антитело должно обладать более высокими свойствами с точки зрения нейтрализации и клиренса антигена по сравнению с его аналогом, который связывается независимо от pH образом (Igawa и др., *Nature Biotechnol* 28(11), 2010, сс. 1203-1207; Devanaboyina и др., *mAbs* 5(6), 2013, сс. 851-859; публикация международной заявки на патент WO 2009/125825).

Одним из объектов изобретения является антитело, которое связывается C1 с более высокой аффинностью в условиях более высокой концентрации кальция по сравнению с условиями с более низкой концентрацией кальция.

В одном из вариантов осуществления изобретения предпочтительными ионами металла являются, например, ион кальция. Ион кальция участвует в модуляции многих биологических явлений, включая сокращение мышц, таких как скелетные, гладкие и сердечные мышцы; активацию движения, фагоцитоза и т.п. лейкоцитов; активацию изменения формы, секреции и т.п. тромбоцитов; активацию лимфоцитов; активацию тучных клеток, включая секрецию гистамина; клеточные реакции, опосредованные альфа-рецептором катехоламина или ацетилхолиновым рецептором; экзоцитоз; высвобождение субстанций-медиаторов из нейронных окончаний; и аксоплазматический поток в нейронах. Известные внутриклеточные рецепторы ионов кальция включают тропонин С, кальмодулин, парвальбумин и легкую цепь миозина, которые имеют несколько сайтов связывания ионов кальция и, вероятно, имеют общее происхождение с точки зрения молекулярной эволюции. Существует также много известных кальцийсвязывающих мотивов. Такие хорошо известные мотивы включают,

например, домены кадгерина, EF-"руку" (мотив типа "спираль-петля-спираль") кальмодулина, С2-домен протеинкиназы С, Gla-домен фактора свертывания крови IX, лектины С-типа рецептора ациарогликопротеина и рецептора, связывающего маннозу, А-домены рецепторов LDL, аннексин, домен тромбоспондина типа 3 и EGF-подобные домены.

В одном из вариантов осуществления изобретения, когда ион металла представляет собой ион кальция, то желательно, чтобы антигенсвязывающая активность была ниже в условиях низкой концентрации ионов кальция, чем в условиях высокой концентрации ионов кальция. Следует отметить, что концентрация внутриклеточных ионов кальция ниже, чем концентрация 10 внеклеточных ионов кальция. И, наоборот, концентрация внеклеточных ионов кальция выше, чем концентрация внутриклеточных ионов кальция. В одном из вариантов осуществления изобретения низкая концентрация ионов кальция предпочтительно составляет от 0,1 микромоля (мкМ) до 30мкМ, более 15 предпочтительно от 0,5мкМ до 10мкМ и наиболее предпочтительно от 1мкМ до 5мкМ, что близко к концентрации ионов кальция в ранних эндосомах *in vivo*. При этом, в одном из вариантов осуществления изобретения высокая концентрация ионов кальция предпочтительно составляет от 100мкМ до 10мкМ, более предпочтительно от 200мкМ до 5мМ и наиболее предпочтительно от 20 0,5мМ до 2,5мМ, что близко к концентрации ионов кальция в плазме (в крови). В одном из вариантов осуществления изобретения предпочтительно, чтобы низкая концентрация ионов кальция представляла собой концентрацию ионов кальция в эндосомах, а высокая концентрация ионов кальция представляла собой концентрацию ионов кальция в плазме. Когда уровень антигенсвязывающей 25 активности сравнивают при низких и при высоких концентрациях ионов кальция, то предпочтительно, чтобы связывание антител было более сильным при высокой концентрации ионов кальция, чем при низкой концентрации ионов кальция. Иными словами, предпочтительно, чтобы антигенсвязывающая активность антитела была более низкой при низкой концентрации ионов 30 кальция, чем при высокой концентрации ионов кальция. Когда уровень связывающей активности выражают в виде константы диссоциации (KD), то величина KD (при низкой концентрации ионов кальция) KD (при высокой концентрации ионов кальция) составляет более 1, предпочтительно 2 или выше,

еще более предпочтительно 10 или выше и еще более предпочтительно 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 или выше. Верхний предел соотношения KD (при низкой концентрации ионов кальция) / KD (при высокой концентрации ионов кальция) не ограничен конкретной величиной, и может представлять собой любую величину, такую как 100, 400, 1000 или 10000, если ее можно определять с помощью методов, известных специалистам в данной области. Вместо KD можно применять константу скорости реакции диссоциации (kd). Если трудно рассчитать величину KD, то активность можно оценивать на основе уровня ответа в виде связывания, с помощью BIACORE®-анализа, в котором анилиты пропускают в такой же концентрации. Когда антигены пропускают по поверхности чипа с иммобилизованными антителами, то ответ в виде связывания при низкой концентрации кальция предпочтительно составляет 1/2 или менее от ответа в виде связывания при высокой концентрации кальция, более предпочтительно 1/3 или менее, еще более предпочтительно 1/5 или менее и наиболее предпочтительно 1/10 или менее. Известно, что в целом *in vivo* внеклеточная концентрация ионов кальция (например, в плазме) является высокой, а внутриклеточная концентрация ионов кальция (например, в эндосоме) является низкой. Таким образом, согласно одному из вариантов осуществления изобретения предпочтительно, чтобы внеклеточные условия характеризовались высокой концентрацией ионов кальция, а внутриклеточные условия характеризовались низкой концентрацией ионов кальция. Когда для антитела характерно, что его антигенсвязывающая активность ниже во внутриклеточных условиях концентрации ионов кальция, чем во внеклеточных условиях концентрации ионов кальция, то, антигены, которые связались с антителом вне клетки, отделяются от антитела внутри клетки, что повышает включение антигена в клетку из внешнего окружения клетки. Указанные антитела при их введении в живой организм могут снижать концентрацию антигена в плазме и снижать физиологическую активность антигенов *in vivo*. Таким образом, указанные антитела являются ценными. Методы скрининга антигенсвязывающих областей или антител, которые обладают более низкой антигенсвязывающей активностью в условиях низкой концентрации ионов кальция, чем в условиях высокой концентрации ионов кальция, включают, например, метод, описанный в WO 2012/073992 (например, в параграфах 0200-

0213). Методы выявления антигенсвязывающих областей, которые обладают способностью слабее связываться с антигенами в условиях низкой концентрации ионов кальция, чем в условиях высокой концентрации ионов кальция, конкретно не ограничены и можно использовать любые методы. В частности, методы
5 включают, например, методы замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка в антигенсвязывающей области на аминокислотный остаток, обладающий способностью хелатировать металлы, и/или встраивания в антигенсвязывающий домен по меньшей мере одного аминокислотного остатка, обладающего способностью хелатировать металлы. Антитела, в которых по
10 меньшей мере один аминокислотный остаток антигенсвязывающей области заменен на аминокислотный остаток, обладающий способностью хелатировать металлы, и/или по меньшей мере один аминокислотный остаток, обладающий способностью хелатировать металлы, встроен в антигенсвязывающий домен, представляют собой предпочтительный вариант антител.

15 Аминокислотные остатки, обладающие способностью хелатировать металлы, предпочтительно включают, например, серин, треонин, аспарагин, глутамин, аспарагиновую и глутаминовую кислоту. Кроме того, аминокислотные остатки, которые изменяют антигенсвязывающую активность антигенсвязывающих областей в зависимости от концентрации ионов кальция,
20 предпочтительно включают, например, аминокислотные остатки, которые образуют кальций-связывающий мотив. Например, кальций-связывающие мотивы известны специалистам в данной области и описаны подробно (см., например Springer и др., Cell 102, 200, сс. 275-277; Kawasaki и Kretsinger, Protein Prof. 2, 1995, сс. 305-490; Moncrief и др., J. Mol. Evol. 30, 1990, сс. 522-562;
25 Chauvaux и др., Biochem. J. 265, 1990, сс. 261-265; Bairoch и Cox FEBS Lett. 269, 1990, сс. 454-456; Davis, New Biol. 2, 1990, сс. 410-419; Schaefer и др., Genomics 25, 1995, сс. 638-643; Economou и др., EMBO J. 9, 1990, сс. 349-354; Wurzburg и др., Structure. 14(6), 2006, сс. 1049-1058). Предпочтительно в качестве кальций-связывающих мотивов применять EF-"руку" в тропонине С, кальмодулине,
30 парвальбумине и легкой цепи миозина; домен С2 в протеинкиназе С; домен Gla в белковом факторе свертывания крови IX; лектин С-типа рецептора ациарогликопротеина и рецептора, связывающего маннозу, ASGPR, CD23 и DC-

SIGN; домен А в рецепторе LDL; домен аннексина; домен кадгерина; домен тромбоспондина типа 3 и EGF-подобный домен.

Антигенсвязывающие области могут содержать аминокислотные остатки, которые изменяют антигенсвязывающую активность в зависимости от концентрации ионов кальция, такие как указанные выше аминокислотные
5 остатки, обладающие способностью хелатировать металлы, и аминокислотные остатки, которые образуют кальций-связывающий мотив. Местоположение указанных аминокислотных остатков в антигенсвязывающей области не ограничено конкретно, и они могут находиться в любом положении, если
10 антигенсвязывающая активность изменяется в зависимости от концентрации ионов кальция. При этом, указанные аминокислотные остатки могут представлять собой индивидуальный остаток или комбинацию двух или большего количества остатков, если антигенсвязывающая активность изменяется в зависимости от концентрации ионов кальция. Аминокислотные остатки
15 предпочтительно включают, например, серин, треонин, аспарагин, глутамин, аспарагиновую и глутаминовую кислоту. Когда антигенсвязывающая область представляет собой переменную область антитела, то аминокислотные остатки могут находиться в переменной области тяжелой цепи и/или переменной области легкой цепи. В предпочтительном варианте осуществления изобретения
20 аминокислотные остатки могут находиться в CDR3 переменной области тяжелой цепи, более предпочтительно в положениях 95, 96, 100а и/или 101 согласно нумерации Кэбота в CDR3 переменной области тяжелой цепи.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения аминокислотные остатки могут находиться в CDR1 переменной области легкой
25 цепи, более предпочтительно в положениях 30, 31 и/или 32 согласно нумерации Кэбота в CDR1 переменной области легкой цепи. В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения аминокислотные остатки могут находиться в CDR2 переменной области легкой цепи, более предпочтительно в положении 50 согласно нумерации Кэбота в CDR2
30 переменной области легкой цепи. Еще в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения аминокислотные остатки могут находиться в CDR3 переменной области легкой цепи, более предпочтительно в положении 92 согласно нумерации Кэбота в CDR3 переменной области легкой цепи.

Кроме того, возможно объединение вышеуказанных вариантов осуществления изобретения. Например, аминокислотные остатки могут находиться в двух или трех CDR, выбранных из CDR1, CDR2 и CDR3

5 вариабельной области легкой цепи, более предпочтительно в одном или нескольких из положений 30, 31, 32, 50 и/или 92 согласно нумерации Кэбота в

 вариабельной области легкой цепи.

Большое количество антигенсвязывающих областей, которые имеют разные последовательности, но в которых (совместно) используются в качестве общей

10 структуры вышеуказанные аминокислотные остатки, которые изменяют антигенсвязывающую активность в зависимости от концентрации ионов кальция, получают в виде библиотеки. Библиотеку можно подвергать скринингу для

 эффективного получения антигенсвязывающих областей, обладающих связывающей активностью в отношении требуемого антигена,

 антигенсвязывающая активность которых изменяется в зависимости от

15 концентрации ионов кальция.

Для целей настоящего описания "аффинность" антитела к C1s выражают в понятиях KD антитела. "KD" антитела означает константу равновесия диссоциации взаимодействия антитело-антиген. Чем больше величина KD,

20 характеризующая связывание антитела с его антигеном, тем слабее его аффинность связывания с указанным конкретным антигеном. Таким образом, в

 контексте настоящего описания выражение "более высокая аффинность при нейтральном значении pH, чем при кислом значении pH" (или эквивалентное выражение "pH-зависимое связывание") означает, что KD антитела при кислом

25 значении pH выше, чем KD антитела при нейтральном значении pH. Например, в контексте настоящего изобретения считается, что антитело связывается с C1s с

 более высокой аффинностью при нейтральном значении pH, чем при кислом значении pH, если KD, характеризующая связывание антитела с C1s при кислом

 значении pH, более чем в 10 раз превышает KD, характеризующую связывание антитела с C1s при нейтральном значении pH. Таким образом, под объем

30 настоящего изобретения подпадают антитела, связывание которых с C1s при кислом значении pH характеризуются величиной KD, которая по меньшей мере в

 11, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 или более раз превышает величину KD, характеризующую

связывание антитела с C1s при нейтральном значении рН. В другом варианте осуществления изобретения величина КD антитела при нейтральном значении рН может составлять 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М или менее. В другом варианте осуществления изобретения величина КD антитела при кислом значении рН может составлять 10^{-9} М, 10^{-8} М, 10^{-7} М, 10^{-6} М или более.

Связывающую способность антитела в отношении конкретного антигена можно выражать также в понятиях kd антитела. Величина "kd" антитела означает константу скорости диссоциации антитела касательно конкретного антигена и ее выражают в единицах, обратных секундам (т.е. с^{-1}). Чем выше величина kd, тем слабее связывание антитела с его антигеном. Таким образом, под объем настоящего изобретения подпадают антитела, связывание которых с C1s характеризуется более высокой величиной kd при кислом значении рН, чем при нейтральном значении рН. Под объем настоящего изобретения подпадают антитела, связывание которых с C1s при кислом значении рН характеризуется величиной kd, которая по меньшей мере в 11, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 или более раз превышает величину kd, характеризующую связывание антитела с C1s при нейтральном значении рН. В другом варианте осуществления изобретения величина kd антитела при нейтральном значении рН может составлять 10^{-2} 1/с, 10^{-3} 1/с, 10^{-4} 1/с, 10^{-5} 1/с, 10^{-6} 1/с или менее. В другом варианте осуществления изобретения величина kd антитела при кислом значении рН может составлять 10^{-3} 1/с, 10^{-2} 1/с, 10^{-1} 1/с или более.

В некоторых случаях "пониженное связывание при кислом значении рН по сравнению с нейтральным значением рН" выражают в понятиях соотношения величины КD антитело при кислом значении рН и величины КD антитела при нейтральном значении рН (или наоборот). Например, для целей настоящего изобретения антитело может рассматриваться, как обладающее "пониженным связыванием с C1s при кислом значении рН по сравнению с его связыванием при нейтральном значении рН", если соотношение КD при кислом/нейтральном значении составляет 10 или более. В конкретных приведенных в качестве примеров вариантах осуществления изобретения для антитела соотношение КD при кислом/нейтральном значении может составлять 11, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 или более. В

другом варианте осуществления изобретения величина KD антитела при нейтральном значении рН может составлять $10^{-7}M$, $10^{-8}M$, $10^{-9}M$, $10^{-10}M$, $10^{-11}M$, $10^{-12}M$ или менее. В другом варианте осуществления изобретения величина KD антитела при кислом значении рН может составлять $10^{-9}M$, $10^{-8}M$, $10^{-7}M$, $10^{-6}M$ или более.

В некоторых случаях "пониженное связывание при кислом значении рН по сравнению с нейтральным значением рН" выражают в понятиях соотношения величины kd антитело при кислом значении рН и величины kd антитела при нейтральном значении рН (или наоборот). Например, для целей настоящего изобретения антитело может рассматриваться, как обладающее "пониженным связыванием с C1s при кислом значении рН по сравнению с его связыванием при нейтральном значении рН", если соотношение kd при кислом/нейтральном значении составляет 2 или более. В конкретных приведенных в качестве примеров вариантах осуществления изобретения для антитела соотношение kd при кислом/нейтральном значении может составлять 11, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000 или более. В другом варианте осуществления изобретения величина kd антитела при нейтральном значении рН может составлять 10^{-2} 1/с, 10^{-3} 1/с, 10^{-4} 1/с, 10^{-5} 1/с, 10^{-6} 1/с или менее. В другом варианте осуществления изобретения величина kd антитела при кислом значении рН может составлять 10^{-3} 1/с, 10^{-2} 1/с, 10^{-1} 1/с или более.

В контексте настоящего описания выражение "кислое значение рН" обозначает рН от 4,0 до 6,5. Выражение "кислое значение рН" включает значения рН 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 и 6,5. В конкретных объектах изобретения "кислое значение рН" составляет 6,0.

В контексте настоящего описания выражение "нейтральное значение рН" обозначает рН от 6,7 до примерно 10,0. Выражение "нейтральное значение рН" включает значения рН 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 и 10,0. В конкретных объектах изобретения "нейтральное значение рН" составляет 7,4.

В контексте настоящего описания выражение "в условиях высокой концентрации кальция" или "при высокой концентрации кальция" означает концентрацию от 100микроМ (мкМ) до 10мМ, более предпочтительно 200мкМ до 5мМ и наиболее предпочтительно от 0,5мМ до 2,5мМ, близкую к концентрации ионов кальция в плазме (в крови). Выражение "в условиях высокой концентрации кальция" или "при высокой концентрации кальция" включает концентрации кальция, составляющие 100мкМ, 200мкМ, 300мкМ, 400мкМ, 500мкМ, 600мкМ, 700мкМ, 800мкМ, 900мкМ, 0,5мМ, 0,7мМ, 0,9мМ, 1мМ, 1,2мМ, 1,4мМ, 1,6мМ, 1,8мМ, 2,0мМ, 2,2 мМ, 2,4мМ, 2,5мМ, 3мМ, 4мМ, 5мМ, 6мМ, 7мМ, 8мМ, 9мМ и 10мМ Ca^{2+} . В конкретных объектах изобретения выражение "в условиях высокой концентрации кальция" или "при высокой концентрации кальция" относится к 1,2мМ Ca^{2+} .

В контексте настоящего описания выражение "в условиях низкой концентрации кальция" или "при низкой концентрации кальция" означает концентрацию от 0,1мкМ до 30мкМ, более предпочтительно от 0,5мкМ до 10мкМ и наиболее предпочтительно от 1мкМ до 5мкМ, близкую к концентрации ионов кальция в эндосоме *in vivo*. Выражение "в условиях низкой концентрации кальция" или "при низкой концентрации кальция" включает концентрации кальция 0,1мкМ, 0,5мкМ, 1мкМ, 1,5мкМ, 2,0мкМ, 2,5мкМ, 2,6мкМ, 2,7мкМ, 2,8мкМ, 2,9мкМ, 3,0мкМ, 3,1мкМ, 3,2мкМ, 3,3мкМ, 3,4мкМ, 3,5мкМ, 4,0мкМ, 5,0мкМ, 6,0мкМ, 7,0мкМ, 8,0мкМ, 9,0мкМ, 10мкМ, 15мкМ, 20мкМ, 25мкМ и 30мкМ Ca^{2+} . В конкретных объектах изобретения выражение "в условиях низкой концентрации кальция" или "при низкой концентрации кальция" относится к 3,0мкМ Ca^{2+} .

Величины KD и величины kd, указанные в настоящем описании, можно определять на основе поверхностного плазмонного резонанса с использованием биосенсора для характеристики взаимодействий антитело-антиген (см., например, пример 5 в настоящем описании). Величины KD и величины kd можно определять при 25 градусах Цельсия (C) или при 37°C. Указанное определение можно осуществлять в присутствии 150мМ NaCl. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанное определение можно осуществлять с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса, в котором антитело является иммобилизованным, антиген служит в качестве аналита и

применяют следующие условия: 20мМ ACES и 150мМ NaCl при 37 градусах Цельсия (С).

В одном из объектов изобретения предложен способ усиления клиренса C1s из плазмы индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает введение индивидууму в эффективном количестве антитела против C1s для усиления клиренса C1s из плазмы. В изобретении предложен также способ усиления клиренса комплекса C1g и C1s из плазмы индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает введение индивидууму в эффективном количестве антитела против C1s для усиления клиренса комплекса C1g и C1s из плазмы. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает введение индивидууму в эффективном количестве антитела против C1s для усиления клиренса C1r2s2 из плазмы. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает введение индивидууму в эффективном количестве антитела против C1s для усиления клиренса C1r2s2 из плазмы, но не клиренса C1q из плазмы.

В другом объекте изобретения предложен способ удаления C1s из плазмы, где способ включает: (а) идентификацию индивидуума, который нуждается в удалении C1s из плазмы индивидуума; (б) получение антитела, которое связывается с C1s через антигенсвязывающий (C1s-связывающий) домен антител, и имеет величину $KD(pH6,0)/KD(pH7,4)$, определенную как отношение KD для C1s при pH 6,0 и KD для C1s при pH 7,4, составляющую от 11 до 10000, где KD определяют методом поверхностного плазмонного резонанса, где антитело связывается с C1s в плазме *in vivo* и диссоциирует от связанного C1s в условиях, присутствующих в эндосоме *in vivo*, и где антитело представляет собой человеческий IgG или гуманизированный IgG; и (в) введение антитела индивидууму. В другом объекте изобретения указанный метод поверхностного плазмонного резонанса можно примерять при 37°C и 150мМ NaCl. В другом объекте изобретения можно применять указанный метода поверхностного плазмонного резонанса, в котором антитело является иммобилизованным, антиген служит в качестве аналита и применяют следующие условия: 20мМ ACES и 150мМ NaCl при 37°C.

Другим объектом изобретения является способ удаления C1s из плазмы субъекта, где способ включает: (а) идентификацию первого антитела, которое

связывается с C1s посредством антигенсвязывающей области первого антитела; (б) идентификацию второго антитела, которое: (1) связывается с C1s посредством антигенсвязывающего (C1s-связывающего) домена второго антитела, (2) является идентичным по аминокислотной последовательности первому антителу за исключением замены по меньшей мере одной аминокислоты вариабельной области первого антитела на гистидин и/или инсерции по меньшей мере одного гистидина в вариабельную область первого антитела, (3) имеет величину $KD(pH6,0)/KD(pH7,4)$, которая превышает величину $KD(pH6,0)/KD(pH7,4)$ первого антитела, и это превышение составляет от 11 до 10000 раз, где $KD(pH6,0)/KD(pH7,4)$ определяют как соотношение KD для C1s при pH 6,0 и KD для C1s при pH 7,4, когда KD определяют с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, (4) связывается с C1s в плазме *in vivo*, (5) диссоциирует от связанного C1s в условиях, присутствующих в эндосоме *in vivo*, и (6) представляет собой человеческий IgG или гуманизированный IgG; (в) идентификацию субъекта, который нуждается в снижении уровня C1s в его/ее плазме; и (г) введение второго антитела субъекту таким образом, чтобы снижался уровень C1s в плазме субъекта. В следующем объекте изобретения указанный метод поверхностного плазмонного резонанса можно применять при 37°C и 150мМ NaCl. В следующем объекте изобретения указанный метод поверхностного плазмонного резонанса можно применять при 37°C и 150мМ NaCl. В следующем объекте изобретения можно применять указанный метод поверхностного плазмонного резонанса, при осуществлении которого антитело является иммобилизованным, антиген служит в качестве анализита и используют следующие условия: 20мМ ACES-буфер и 150мМ NaCl при 37°C.

Другим объектом изобретения является способ удаления C1s из плазмы субъекта, где способ включает: (а) идентификацию первого антитела, которое (1) связывается с C1s посредством антигенсвязывающей области первого антитела, (2) является идентичным по аминокислотной последовательности второму антителу, которое связывается с C1s посредством антигенсвязывающего (C1s-связывающего) домена второго антитела, за исключением того, что в вариабельной области первого антитела присутствует по меньшей мере один или несколько остаток(ов) гистидина, который(ые) не соответствует(ют)

вариабельной области второго антитела, (3) имеет величину $KD(pH6,0)/KD(pH7,4)$, которая превышает величину $KD(pH6,0)/KD(pH7,4)$ второго антитела, и это превышение составляет от 11 до 10000 раз, где $KD(pH6,0)/KD(pH7,4)$ определяют как соотношение KD для C1s при pH 6,0 и KD для C1s при pH 7,4, когда KD определяют с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, (4) связывается с C1s в плазме *in vivo*, (5) диссоциирует от связанного C1s в условиях, присутствующих в эндосоме *in vivo*, и (6) представляет собой человеческий IgG или гуманизированный IgG; (в) идентификацию субъекта, который нуждается в снижении уровня C1s в его/ее плазме; и (г) введение первого антитела субъекту таким образом, чтобы снижался уровень C1s в плазме субъекта. В следующем объекте изобретения указанный метод поверхностного плазмонного резонанса можно применять при 37°C и 150мМ NaCl. В следующем объекте изобретения указанный метод поверхностного плазмонного резонанса можно применять при 37°C и 150мМ NaCl. В следующем объекте изобретения можно применять указанный метод поверхностного плазмонного резонанса, при осуществлении которого антитело является иммобилизованным, антиген служит в качестве аналита и используют следующие условия: 20мМ ACES и 150мМ NaCl при 37°C. В некоторых вариантах антитело ингибирует компонент классического пути комплемента; в некоторых вариантах компонент классического пути комплемента представляет собой C1s.

(a4) pI выделенного антитела

В одном из вариантов осуществления изобретения изоэлектрическую точку (pI) выделенного антитела снижают путем изменения константной области. В указанном варианте осуществления изобретения выделенное антитело со сниженной pI содержит по меньшей мере одно аминокислотное изменение (например, аминокислотное добавление, инсерцию, делецию или замену) в константной области по сравнению с родительской константной областью антитела. В следующих вариантах осуществления изобретения каждое аминокислотное изменение снижает изоэлектрическую точку (pI) константной области по сравнению с родительской константной областью. В следующих вариантах осуществления изобретения аминокислота может экспонироваться на поверхности области. pI можно сравнивать между родительским антителом

(исходное антитело до изменения, предлагаемого в настоящем изобретении) и антителом после изменения, предлагаемого в настоящем изобретении, при котором одну или несколько аминокислотных мутаций (например, добавлений, инсерций, делеций или замен) интродуцируют в константную область антитела (родительская константная область) исходного (родительского) антитела.

5 Аминокислотные изменения снижают изоэлектрическую точку (pI) мутантной константной области по сравнению с родительской константной областью. Это означает, что антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, имеет мутантную константную область, которая содержит по меньшей мере

10 аминокислотное изменение, где аминокислотное изменение снижает изоэлектрическую точку (pI) мутантной константной области по сравнению с родительской константной областью. Исходное (родительское) антитело может представлять собой любое известное или впервые выделенное антитело, если оно специфически связывается с C1s. В одном из объектов изобретения pI

15 измененного антитела против C1s по меньшей мере на 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2,0 единицы ниже, чем pI исходного (родительского) антитела. pI измененного антитела против C1s предпочтительно ниже на 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 ниже, предпочтительно ниже на 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 или 1,5 и более предпочтительно ниже на 1,6, 1,7, 1,8, 1,9

20 или 2,0 единицы, чем pI исходного (родительского) антитела. В следующих вариантах осуществления изобретения выделенное антитело содержит константную область и антигенсвязывающий домен. В следующих вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающая активность антигенсвязывающего домена варьируется в зависимости от концентрации ионов

25 в среде.

В следующих вариантах осуществления изобретения константная область со сниженной pI, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере одно аминокислотное изменение по меньшей мере в одном положении, выбранным их группы, которая состоит из: 137, 268, 274, 285, 311, 312, 315, 318,

30 333, 335, 337, 341, 342, 343, 355, 384, 385, 388, 390, 399, 400, 401, 402, 413, 419, 420, 422 и 431 согласно EU-нумерации. Предпочтительно мутантная константная область со сниженной pI содержит аминокислотное изменение по меньшей мере в одном из положений 137, 268, 274, 355 и 419 согласно EU-нумерации. В

следующих вариантах осуществления изобретения в константной области со сниженной рI аминокислота в каждом из выбранных положений заменена на любую одну из следующих аминокислот: аргинин, глутаминовая кислота, серин и глутамин.

5 В конкретном варианте осуществления изобретения в константной области со сниженной рI аминокислоты в положениях 137, 268, 274, 355 и 419 (все номера соответствуют системе EU-нумерации) заменены на любую одну из следующих аминокислот: аргинин, глутаминовая кислота, серин и глутамин.

10 В одном из вариантов осуществления изобретения изоэлектрическую точку (рI) выделенного антитела можно снижать также путем изменения вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи. Согласно вариантам осуществления изобретения выделенное антитело со сниженной рI содержит по меньшей мере одно аминокислотное изменение в вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи по сравнению с
15 родительской областью. Указанная рI, пониженная путем изменения вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, или рI, пониженная путем изменения константной области, может способствовать улучшению ФК выделенного антитела.

20 В одном из вариантов выделенного антитела рI антитела составляет 7,8 или ниже, 7,7 или ниже, 7,6 или ниже, или 7,5 или ниже. рI предпочтительно составляет 7,7 или ниже, более предпочтительно 7,6 или ниже, еще более предпочтительно 7,5 или ниже. Когда рI ниже или равна любой из указанных величин, то время полужизни антител в крови пролонгируется. С другой
25 стороны, возможная минимальная величина рI в норме составляет 4,28 или выше.

В одном из вариантов осуществления изобретения рI антитела можно измерять с помощью капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF). В качестве примера варианта осуществления изобретения сIEF осуществляли с использованием системы визуализации всего капилляра фирмы ProteinSimple
30 iCE 3 с использованием капиллярных картриджей с фторуглеродным покрытием. Растворы анолита и католита представляли собой 0,08М фосфорную кислоту в 0,1% (мас./об.) метилцеллюлозы (МЦ) и 0,1М гидроксид натрия в 0,1% (мас./об.) МЦ соответственно. Все анализируемые образцы содержали рабочие растворы,

включающие 0,2 мг/мл антитела, 0,35% (мас./об.) МЦ, 6мМ IDA (иминодиуксусная кислота), 10мМ аргинин, 0,5% (мас./об.) рI-маркера (5,85) и 0,5% (мас./об.) рI-маркера (9,99), а также 2 об.% фармалита 8-10,5 и 2 об.% фармалита 5-8. Все образцы интенсивно перемешивали и кратковременно центрифугировали перед загрузкой в отсек для автоматического отбора проб (автосамплер). Образцы инкубировали в автосамплере в течение 2 ч до начала измерений. После фокусирования при напряжении 1,5 кВ в течение 1 мин осуществляли фокусирование при напряжении 3,0 кВ в течение 7 мин. Отсек автосамплера выдерживали при 10°C. Измерения повторяли дважды для каждого образца и величины рI каждого образца получали путем расчета среднего значения для n=2 измерений.

Альтернативно этому, в одном из вариантов осуществления изобретения рI антитела можно измерять с помощью капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF). В качестве примера варианта осуществления изобретения сIEF осуществляли с использованием системы визуализации всего капилляра фирмы ProteinSimple iCE 3 с использованием капиллярных картриджей с фторуглеродным покрытием. Растворы анолита и католита представляли собой 0,08М фосфорную кислоту в 0,1% (мас./об.) метилцеллюлозы (МЦ) и 0,1М гидроксид натрия в 0,1% (мас./об.) МЦ соответственно. Все анализируемые образцы содержали рабочие растворы, включающие 0,35% (мас./об.) МЦ, 4мМ IDA (иминодиуксусная кислота), 10мМ аргинин, рI-макеры (3,21 или 4,22, или 4,65, или 5,12, или 5,85, или 6,14, или 6,61, или 7,05, или 7,65, или 8,40, или 8,79, или 9,46, или 9,77, или 10,1) и одну из указанных смесей 4% (об./об.) фармалита 3-10. Все образцы интенсивно перемешивали и кратковременно центрифугировали перед загрузкой в отсек автосамплера. После фокусирования при напряжении 1,5 кВ в течение 1 мин осуществляли фокусирование при напряжении 3,0 кВ в течение 8 мин. Отсек автосамплера выдерживали при 10°C. Измерения повторяли дважды для каждого образца и величины рI каждого образца получали путем расчета среднего значения для n=2 измерений.

В одном из указанных вариантов осуществления изобретения рI измеряли с помощью капиллярного изоэлектрического фокусирования, при осуществлении которого раствор, содержащий 0,08М фосфорную кислоту в 0,1% (мас./об.) метилцеллюлозе (МЦ), применяли в качестве раствора анолита, раствор,

содержащий 0,1М гидроксид натрия в 0,1% (мас./об.) МЦ, применяли в качестве раствора католита и раствор, содержащий 0,5 мг/мл антитела, 0,3% (мас./об.) МЦ, 6,0мМ иминодиуксусную кислоту (IDA), 10мМ аргинин, 4М мочевины и рI-маркеры (7,65 и 9,77), применяли в качестве рабочего раствора для лизиса антитела.

(a5) Антигенсвязывающая область

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит антигенсвязывающую область. В предпочтительном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающая область может специфически связываться с эпитопом в CUB1-EGF-CUB2-домене C1s. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающая область может специфически связываться с CUB1-EGF-CUB2-доменом C1s. В указанных вариантах осуществления изобретения C1s включает (но не ограничиваясь только им) человеческий C1s. C1s предпочтительно представляет собой человеческий C1s.

В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающая область может представлять собой переменную область антитела.

Переменная область антитела может представлять собой полную или частичную переменную область антитела, если антигенсвязывающая область не нарушает свойство выделенного антитела, такое как функция вытеснения и/или блокирующая функция, и указанную ниже связывающую активность антитела;

в случае, когда связывающую активность антитела в отношении C1s человека и/или обезьян циномоглус измеряют с помощью поверхностного плазмонного резонанса, то

I) величину константы диссоциации (KD) в диапазоне нейтральных значений pH удается надежно рассчитывать, а величину KD в диапазоне кислых значений pH не удается надежно рассчитывать из-за отсутствия связывающей активности или весьма низкой связывающей активности, или

II) соотношение величины KD в диапазоне кислых значений pH и величины KD в диапазоне нейтральных значений pH, т.е. соотношение KD в кислой среде/ KD в нейтральной среде, составляет более 10, при условии, что величины KD и в диапазоне нейтральных значений pH, и в диапазоне кислых значений pH удается надежно рассчитывать.

В одном из вариантов осуществления изобретения переменная область антитела является гуманизированной. Антигенсвязывающая область предпочтительно представляет собой гуманизированную переменную область антитела. Следует ожидать, что удастся избежать побочных действий по сравнению с негуманизированным антителом при применении указанного гуманизированного антитела для медикаментозного лечения.

В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающая область выделенного антитела против C1s содержит комбинацию HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, выбранную из группы, которая состоит из участков, указанных ниже в подпунктах 1)-6):

1) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 60, 61 и 62 соответственно;

2) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 37, 38, 39, 56, 57 и 58 соответственно;

3) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 56, 57 и 58 соответственно;

4) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 48, 49 и 50 соответственно;

5) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 52, 53 и 54 соответственно; и

6) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 33, 34, 35, 56, 57 и 58 соответственно.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело против C1s содержит переменную область тяжелой цепи, переменную область легкой цепи и константную область антитела. В одном и вариантов осуществления изобретения выделенное антитело против C1s содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область

легкой цепи (VL), выбранную из группы, которая состоит из областей, указанных ниже в подпунктах 1)-6):

1) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 24 и 59 соответственно;

5 2) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 36 и 55 соответственно;

3) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 24 и 55 соответственно;

10 4) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 24 и 47 соответственно;

5) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 28 и 51 соответственно; и

6) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 32 и 55 соответственно.

15 (а6) Константная область антитела

В одном из вариантов осуществления изобретения константная область антитела в выделенном антителе содержит (но не ограничиваясь только ею) константную область человеческого антитела. Константная область человеческого антитела может включать тяжелую цепь и легкую цепь.

20 Человеческое антитело включает (но не ограничиваясь только им) человеческий IgG1. Человеческое антитело предпочтительно представляет собой человеческий IgG1.

В одном из вариантов осуществления изобретения константная область антитела содержит по меньшей мере одну аминокислоту, которая может
25 повышать связывающую способность выделенного антитела в отношении FcRn в диапазоне кислых значений pH по сравнению с выделенным антителом, в котором отсутствует по меньшей мере одна указанная аминокислота.

В одном из вариантов осуществления изобретения константная область
30 содержит

(а) Ala в положении 434; Glu, Arg, Ser или Lys в положении 438; и Glu, Asp или Gln в положении 440 согласно EU-нумерации;

(б) Ala в положении 434; Arg или Lys в положении 438; и Glu или Asp в положении 440 согласно EU-нумерации;

(в) Ile или Leu в положении 428; Ala в положении 434; Ile, Leu, Val, Thr или Phe в положении 436; Glu, Arg, Ser или Lys в положении 438; и Glu, Asp или Gln в положении 440 согласно EU-нумерации;

5 (г) Ile или Leu в положении 428; Ala в положении 434; Ile, Leu, Val, Thr или Phe в положении 436; Arg или Lys в положении 438; и Glu или Asp в положении 440 согласно EU-нумерации;

(д) Leu в положении 428; Ala в положении 434; Val или Thr в положении 436; Glu, Arg, Ser или Lys в положении 438; и Glu, Asp или Gln в положении 440 согласно EU-нумерации; или

10 (е) Leu в положении 428; Ala в положении 434; Val или Thr в положении 436; Arg или Lys в положении 438; и Glu или Asp в положении 440 согласно EU-нумерации.

15 В WO 2013/046704 описаны конкретные двойные замены аминокислотных остатков Q438R/S440E, Q438R/S440D, Q438K/S440E и Q438K/S440D согласно EU-нумерации, которые приводят к значительному снижению связывания ревматоидного фактора при объединении с аминокислотной заменой, которая повышает связывание FcRn в кислых условиях.

20 В одном из вариантов осуществления изобретения константная область предпочтительно содержит комбинацию аминокислотных замен, выбранную из группы, которая состоит из:

(I) (а) N434A/Q438R/S440E; (б) N434A/Q438R/S440D; (в) N434A/Q438K/S440E; (г) N434A/Q438K/S440D; (д) N434A/Y436T/Q438R/S440E; (е) N434A/Y436T/Q438R/S440D; (ж) N434A/Y436T/Q438K/S440E; (з) N434A/Y436T/Q438K/S440D; (и) N434A/Y436V/Q438R/S440E; (к) N434A/Y436V/Q438R/S440D; (л) N434A/Y436V/Q438K/S440E; (м) N434A/Y436V/Q438K/S440D; (н) N434A/R435H/F436T/Q438R/S440E; (о) N434A/R435H/F436T/Q438R/S440D; (п) N434A/R435H/F436T/Q438K/S440E; (р) N434A/R435H/F436T/Q438K/S440D; (с) N434A/R435H/F436V/Q438R/S440E; (т) N434A/R435H/F436V/Q438R/S440D; (у) N434A/R435H/F436V/Q438K/S440E; (ф) N434A/R435H/F436V/Q438K/S440D; (х) M428L/N434A/Q438R/S440E; (ц) M428L/N434A/Q438R/S440D; (ч) M428L/N434A/Q438K/S440E; (ш) M428L/N434A/Q438K/S440D; (щ) M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E; (э) M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440D; (аа) M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440E;

(аб) M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440D; (ав)
M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440E; (ар) M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440D;
(ад) M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440E; (ае)
M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440D; (аж)

5 L235R/G236R/S239K/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E; (аз)
L235R/G236R/A327G/A330S/P331S/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E согласно
EU-нумерации; или

(II) (а) N434A/Q438R/S440E; (б) N434A/Y436T/Q438R/S440E; (в)

N434A/Y436V/Q438R/S440E; (г) M428L/N434A/Q438R/S440E; (д)

10 M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E; (е) M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440E; (ж)
L235R/G236R/S239K/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E; и (з)
L235R/G236R/A327G/A330S/P331S/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E согласно
EU-нумерации.

В другом варианте осуществления изобретения константная область
15 предпочтительно содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из
группы, которая состоит из лейцина в положении 428, аланина в положении 434 и
треонина в положении 436 (все номера согласно системе EU-нумерации). В
одном из вариантов осуществления изобретения константная область более
предпочтительно содержит лейцин в положении 428, аланин в положении 434 и
20 треонин в положении 436 (все номера согласно системе EU-нумерации).

Варианты Fc-области

(Технология "подметания")

В некоторых вариантах осуществления изобретения одну или несколько
аминокислотных модификаций можно интродуцировать в Fc-область антитела,
25 представленного в настоящем описании, создавая тем самым вариант Fc-
области. Вариант Fc-области может содержать последовательность человеческой
Fc-области (например, Fc-области IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), содержащую
аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или нескольких
аминокислотных положениях. В некоторых вариантах осуществления
30 изобретения Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG1.

Для усиления снижения концентрации антигена в плазме и/или улучшения
фармакокинетики антител аминокислотные остатки в сайте связывания с FcRn в
Fc-области IgG можно модифицировать для повышения их поглощения

клетками. Когда антитело с рН-зависимостью модифицируют таким образом, то мутант должен представлять собой антитело-"мусорщик", которое может сильнее связываться с FcRn и обеспечивает более эффективный перенос антигена в эндосому (имеющую кислое значение рН) и его последующее расщепление, но само может эффективно рециркулировать к клеточной поверхности. Указанное модифицированное антитело-"мусорщик" может сильно связываться с FcRn при нейтральном значении рН на клеточной поверхности и повышать поглощение и расщепление антигена по сравнению с исходным (родительским) антителом без модификации (Semin Immunopathol. 40(1), 2018, сс. 125-140).

В некоторых объектах изобретения антитело содержит Fc-область, которая содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию Fc-области, обуславливающую усиление снижения концентрации антигена в плазме и/или улучшение фармакокинетики антитела.

Область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора является особенно предпочтительно в качестве константной области антитела, предлагаемого в настоящем изобретении. Например, антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, имеет мутантную константную область, содержащую по меньшей мере одно аминокислотное изменение, которое снижает связывающую активность в отношении Fcγ-рецептора. В настоящем описании понятие "Fcγ-рецептор" (который обозначают также в настоящем описании как рецептор Fcγ, FcγR или FcγR) относится к рецептору, который может связываться с Fc-областью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, и включает всех членов, принадлежащих к семейству белков, кодируемых в основном генами Fcγ-рецептора. У людей это семейство включает (но не ограничиваясь только ими) FcγRI (CD64), включая изоформы FcγRIa, FcγRIb и FcγRIc; FcγRII (CD32), включая изоформы FcγRIIa (включая аллотипы H131 (H-тип) и R131 (R-тип), FcγRIIb (включая FcγRIIb-1 и FcγRIIb-2) и FcγRIIc; и FcγRIII (CD16), включая изоформы FcγRIIIa (включая аллотипы V158 и F158) и FcγRIIIb (включая аллотипы FcγRIIIb-NA1 и FcγRIIIb-NA2); а также любые человеческие FcγR, изоформы или аллотипы FcγR, которые пока не открыты. FcγR включают (но не ограничиваясь только ими) FcγR из организма человека, мышей, крыс, кроликов и обезьян, и они могут иметь происхождение из любого организма. Мышиные

FcγR включают (но не ограничиваясь только ими) FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) и FcγRIII-2 (CD16-2), а также любые мышинные FcγR, изоформы или аллотипы FcγR, которые пока не открыты. Соответствующие примеры указанных Fcγ-рецепторов включают человеческие FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), FcγRIIb (CD32), FcγRIIIa (CD16) и/или FcγRIIIb (CD16).

Среди FcγR присутствуют активирующие рецепторы, которые несут активирующий мотив на основе тирозина иммунорецептора (ITAM) и ингибирующие рецепторы, которые несут ингибирующий мотив на основе тирозина иммунорецептора (ITIM). FcγR подразделяют на активирующие FcγR: FcγRI, FcγRIIa R, FcγRIIa H, FcγRIIIa и FcγRIIIb и ингибирующие FcγR: FcγRIIb.

Полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность FcγRI представлены в NM_000566.3 и NP_000557.1 соответственно; полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность FcγRIIa представлены в BC020823.1 и AAN20823.1 соответственно; полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность FcγRIIb представлены в BC146678.1 и AAI46679.1 соответственно; полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность FcγRIIIa представлены в BC033678.1 и AAN33678.1 соответственно; и полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность FcγRIIIb представлены в BC128562.1 и AAI28563.1 соответственно (регистрационные номера RefSeq). Для FcγRIIa известно два типа генных полиморфизмов, при которых аминокислота в положении 131 FcγRIIa замена на гистидин (тип H) или аргинин (тип R) (J. Exp. Med, 172, 1990, сс. 19-25). Кроме того, для FcγRIIb известно два типа генных полиморфизмов, при которых аминокислота в положении 232 FcγRIIb заменена на изолейцин (тип I) или треонин (тип T) (Arthritis. Rheum. 46, 2002, сс. 1242-1254). Помимо этого, для FcγRIIIa известно два типа генных полиморфизмов, при которых аминокислота в положении 158 FcγRIIIa замена на валин (тип V) или фенилаланин (тип F) (J. Clin. Invest. 100(5), 1997, сс. 1059-1070). Кроме того, для FcγRIIIb известно два типа генных полиморфизмов, которые представляют собой тип NA1 и тип NA2 (J. Clin. Invest. 85, 1990, сс. 1287-1295).

Снижается ли связывающая активность в отношении Fcγ-рецептора можно подтвердить с помощью хорошо известных методов, таких как FACS, ELISA-

формат, скрининг на основе гомогенного анализа усиленной за счет эффекта близости люминисценции (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay (ALPHA), BIACORE-метод на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и другие методы (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(11), 2006, сс. 4005-4010).

5 Например, связывающую способность каждого образца в отношении FcγR при pH 7,4 определяют при 25°C с помощью устройства BIACORE® T200 (фирма Cytiva). Сначала белок L (фирма BioVision) иммобилизуют на всех проточных ячейках сенсорного CM4-чипа, используя набор для амминного сочетания, тип 2 (фирма Cytiva). В качестве подвижного буфера применяют 10 50мМ фосфатный буфер (pH 7,4), содержащий 150мМ NaCl, 0,05% Tween® 20, и антитела, подготовленные так, чтобы их ответ в виде связывания соответствовал 500 RU или 2000 RU, захватывают на сенсорной поверхности. Инъецируют FcγR, разбавленные подвижным буфером (например, человеческие или обезьяньи FcγR), и оценивают уровень связывания с антителами. Сенсорную поверхность 15 регенерируют в каждом цикле, используя 10мМ раствор гидрохлорида глицина, pH 1,5. Исходя из полученных результатов измерений, рассчитывают уровень связывания FcγR, деленный на уровень связывания каждого захваченного антитела (связывание/захват), используя оценочное программное обеспечение BIACORE® T200, версия 2.0 (фирма Cytiva). То есть, поскольку уровень 20 связывания FcγR зависит от количества захваченного антитела, скорректированные значения рассчитываются путем деления уровня связывания FcγR на количество каждого захваченного антитела и сравниваются между антителами.

Для антител, предлагаемых в настоящем изобретении, уровень связывания 25 FcγR, деленный на уровень связывания каждого захваченного антитела (связывание/захват) составляет 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, 0,02 или 0,01 или менее, предпочтительно составляет 0,05, 0,04, 0,03 или 0,02 или менее, или наиболее предпочтительно составляет 0,01 или менее, или его не удастся надежно рассчитывать из-за 30 отсутствия связывающей активности или весьма низкой связывающей активности. Кроме того, относительную связывающую активность в отношении Fcγ-рецептора антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, которое содержит мутантную константную область, содержащую по меньшей мере одно

аминокислотное изменение, которое снижает связывающую активность в отношении Fcγ-рецептора по сравнению с антителом, имеющим (родительскую) константную область, которая не содержит аминокислотное изменение, можно выразить в виде относительного значения (относительное связывание с

5 человеческими FcγR), которое рассчитывают путем деления значения "связывание/захват", полученного для антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, которое имеет константную область, содержащую по меньшей мере одно аминокислотное изменение, которое снижает связывающую

10 активность в отношении Fcγ-рецептора, на значение "связывание/захват", полученного для антитела, которое имеет (родительскую) константную область, не содержащую аминокислотное изменение (например, герцептина). Относительное значение составляет 0,06 или ниже, 0,05 или ниже, 0,04 или ниже, 0,03 или ниже, 0,02 или ниже, 0,01 или ниже, или 0.00 или ниже, или предпочтительно 0,00 или ниже, или его не удастся надежно рассчитывать из-за

15 отсутствия связывающей активности или весьма низкой связывающей активности.

ALPHA-скрининг осуществляют с применением технологии ALPHA, которая основана на описанном ниже принципе, с использованием двух типов гранул, доноров и акцепторов. Люминесцентный сигнал поддается обнаружению

20 только тогда, когда молекулы, связанные с гранулами-донорами, биологически взаимодействуют с молекулами, связанными с гранулами-акцепторами, и когда обе гранулы находятся в непосредственной близости друг от друга. Возбужденный лазерным пучком фотосенсибилизатор в гранулах-донорах превращает кислород, окружающий гранулу, в возбужденный синглетный

25 кислород. Когда синглетный кислород диффундирует от гранул-доноров и достигает гранул-акцепторов, локализованных в непосредственной близости, то в гранулах индуцируется хемилюминесцентная реакция, что в итоге приводит к испусканию света. Если молекулы, связанные с гранулами-донорами, не взаимодействуют с молекулами, связанными с гранулами-акцепторами, то

30 хемилюминесцентная реакция не происходит, поскольку синглетный кислород, который продуцируется гранулами-донорами, не достигает гранул-акцепторов.

Например, когда антитело содержит Fc-область антитела, такую как FcRn-связывающий домен, то получают антитело, имеющее Fc-область дикого типа, и

антитело, имеющее мутантную Fc-область, полученную путем добавления аминокислотных мутаций для изменения связывания с Fc γ -рецептором, биотинилированное антитело связывают с гранулами-донорами, а Fc γ -рецептор, меченный глутатион-S-трансферазой (GST), связывают с гранулами-акцепторами. В присутствии антитела, имеющего мутантную Fc-область, антитело, имеющее Fc-область дикого типа, взаимодействует с Fc γ -рецептором и продуцирует сигналы с длиной волны 520-620 нм. Когда антитело, которое имеет мутантную Fc-область, не имеет метки, оно конкурирует с антителом, имеющим Fc-область дикого типа, за взаимодействие с Fc γ -рецептором.

Относительную аффинность связывания можно оценивать, определяя количественно снижение флуоресценции в результате конкуренции. Методы биотинилирования антигенсвязывающих молекул или антител, таких как указанные антитела, с помощью сульфо-NHS-биотина или подобных агентов являются хорошо известными. В качестве метода мечения Fc γ -рецептора с помощью GST, можно адаптировать метод экспрессии Fc γ -рецептора и GST в клетке, несущей вектор, который может экспрессировать слитый ген, полученный путем слияния полинуклеотида, кодирующего Fc γ -рецептор, в рамке считывания с кодирующим GST полинуклеотидом, и очистки с помощью содержащей глутатион колонки. Полученный сигнал предпочтительно можно анализировать, например, посредством подгонки к односайтовой модели конкуренции на основе нелинейного регрессионного анализа с использованием такого программного обеспечения, как GRAPHPAD PRISM (фирма GraphPad; Сан-Диего).

Одну из субстанций (лиганд), предназначенных для исследования взаимодействия, иммобилизуют на тонкой золотой пленке на сенсорном чипе, и при освещении светом с задней поверхности сенсорного чипа таким образом, чтобы имело место полное отражение на границе раздела между тонкой золотой пленкой и стеклом, в части отраженного света формируется участок с уменьшенной интенсивностью отражения (сигнал SPR). Другую субстанцию, предназначенную для исследования взаимодействия (аналит), инъецируют на поверхность сенсорного чипа; и когда лиганд связывается с аналитом, масса иммобилизованной молекулы-лиганда возрастает, и показатель преломления растворителя на поверхности сенсорного чипа изменяется. Указанное изменение

показателя преломления приводят к сдвигу положения SPR-сигнала (и наоборот, положение сигнала возвращается в исходное, если происходит диссоциация указанного связывания). С помощью системы Biacore определяют уровень упомянутого выше сдвига, или более конкретно изменение массы в зависимости от времени, путем построения графика изменения массы на поверхности сенсорного чипа по вертикальной оси в качестве выходных данных (в виде сенсограммы). Кинетические параметры, такие как константа скорости ассоциации (k_a) и константа скорости диссоциации (k_d) определяют из представленных в виде кривых сенсограмм, и определяют аффинность (KD) как отношение указанных констант. Можно применять также BIACORE-метод в качестве метода для анализа ингибирования. Пример такого метода для анализа ингибирования описан в Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(11), 2006, сс. 4005-4010.

В контексте настоящего описания понятие "пониженная связывающая активность в отношении Fcγ-рецептора" или "пониженная Fcγ-рецептор-связывающая активность" означает, например, что осуществляя изучение с помощью описанного выше аналитического метода, сравнивают связывающую активность в отношении Fcγ-рецептора антитела, которое имеет константную область применяемого в качестве контроля антитела (например, родительского антитела, т.е. исходного антитела до изменения, предлагаемого в настоящем изобретении), со связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора антитела после изменения, предлагаемого в настоящем изобретении, при котором одну или несколько аминокислотных мутаций (например, добавлений, инсерций, делеций или замен) интродуцируют в константную область исходного (родительского) антитела, и устанавливают, что связывающая активность антитела после изменения, предлагаемого в настоящем изобретении, составляет 50% или менее, предпочтительно 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 9% или менее, 8% или менее, 7% или менее, 6% или менее, или особенно предпочтительно 5% или менее, 4% или менее, 3% или менее, 2% или менее, 1% или менее, или 0%, по сравнению со связывающей активностью родительского антитела.

В качестве контрольного антитела (родительского антитела) можно применять антитела до их изменения, которые, например, имеют домен,

содержащий Fc-область моноклонального антитела IgG1-, IgG2-, IgG3- или IgG4-класса. Кроме того, когда в качестве тестируемой субстанции применяют антитело, содержащее мутант Fc-области антитела конкретного изотипа, то воздействие мутации, которую несет мутант, на связывающую активность в отношении Fcγ-рецептора, оценивают с использованием в качестве контроля антитело, которое имеет Fc-область антитела указанного конкретного изотипа. Таким путем можно получать антитела, содержащие мутант Fc-области, пониженная связывающая активность которых в отношении Fcγ-рецептора подтверждена.

10 Примеры указанных мутантов включают мутантов с делеций 231A-238S (WO 2009/011941) или мутанты C226S, C229S, P238S, (C220S) (J. Rheumatol 34, 2007, с. 11), C226S, C229S (Hum. Antibod. Hybridomas 1(1), 1990, сс. 47-54), C226S, C229S, E233P, L234V или L235A (Blood 109, 2007, сс. 1185-1192), в которых нумерация аминокислот соответствует EU-нумерации.

15 Так, соответствующие примеры включают антитела, имеющие Fc-область, в которой аминокислоты в положениях 220, 226, 229, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 264, 265, 266, 267, 269, 270, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 325, 327, 328, 329, 330, 331 и 332, обозначенные согласно EU-нумерации, заменены среди аминокислот, образующих Fc-область антитела конкретного изотипа.

20 Предпочтительными являются положения 235 и 236. Изобретение не ограничено изотипом антитела, из которого получают Fc-область, и можно использовать соответственно Fc-область, полученную из моноклонального антитела IgG1-, IgG2-, IgG3- или IgG4-изотипа, и приемлемым является применение Fc-области, имеющей происхождение из встречающегося в естественных условиях человеческого антитела IgG1-изотипа.

25 Например, приемлемым является применение антитела, имеющего Fc-область, которая содержит любую замену, указанную ниже, где нумерация аминокислот, образующих Fc-область антитела IgG1-изотипа, соответствует EU-нумерации (где номер обозначает положение аминокислотного остатка согласно EU-нумерации, однобуквенный код аминокислоты, расположенный перед номером, обозначает аминокислотный остаток до замены, а однобуквенный код аминокислоты, расположенный после номера, обозначает аминокислотный остаток после замены):

- (a) L234F, L235E, P331S,
- (б) C226S, C229S, P238S,
- (в) C226S, C229S,
- (г) C226S, C229S, E233P, L234V, L235A;

5 или Fc-область, в которой отсутствует аминокислотная последовательность, простирающаяся от положения 231 до 238 в аминокислотах, образующих Fc-область антитела IgG1-изотипа.

Кроме того, приемлемым является применение антитела, имеющего Fc-область, которая содержит любую замену, указанную ниже, где нумерация аминокислот, образующих Fc-область антитела IgG2-изотипа, соответствует EU-нумерации (где номер обозначает положение аминокислотного остатка согласно EU-нумерации, однобуквенный код аминокислоты, расположенный перед номером, обозначает аминокислотный остаток до замены, а однобуквенный код аминокислоты, расположенный после номера, обозначает аминокислотный остаток после замены):

- (д) H268Q, V309L, A330S, P331S
- (е) V234A
- (ж) G237A
- (з) V234A, G237A
- 20 (и) A235E, G237A
- (к) V234A, A235E, G237A.

Кроме того, приемлемым является применение антитела, имеющего Fc-область, которая содержит любую замену, указанную ниже, где нумерация аминокислот, образующих Fc-область антитела IgG3-изотипа, соответствует EU-нумерации (где номер обозначает положение аминокислотного остатка согласно EU-нумерации, однобуквенный код аминокислоты, расположенный перед номером, обозначает аминокислотный остаток до замены, а однобуквенный код аминокислоты, расположенный после номера, обозначает аминокислотный остаток после замены):

- 30 (л) F241A
- (м) D265A
- (н) V264A.

Кроме того, приемлемым является применение антитела, имеющего Fc-область, которая содержит любую замену, указанную ниже, где нумерация аминокислот, образующих Fc-область антитела IgG4-изотипа, соответствует EU-нумерации (где номер обозначает положение аминокислотного остатка согласно EU-нумерации, однобуквенный код аминокислоты, расположенный перед номером, обозначает аминокислотный остаток до замены, а однобуквенный код аминокислоты, расположенный после номера, обозначает аминокислотный остаток после замены):

(o) L235A, G237A, E318A

(п) L235E

(р) F234A, L235A.

Другие предпочтительные примеры включают антитела, имеющие Fc-область, в которой аминокислоты в положениях 233, 234, 235, 236, 237, 327, 330, и 331, обозначенные согласно EU-нумерации, заменены в аминокислотной последовательности, образующей Fc-область встречающегося в естественных условиях человеческого антитела IgG1-изотипа, на аминокислоты в соответствующих положениях согласно EU-нумерации в IgG2 или IgG4.

Другие предпочтительные примеры могут включать антитела, имеющие Fc-область, в которой любая(ые) одна или несколько аминокислот в положениях 235 и 236 согласно EU-нумерации, среди аминокислот, образующих Fc-область встречающегося в естественных условиях человеческого антитела IgG1-изотипа, заменена(ы) на другие аминокислоты. Тип аминокислоты после замещения не ограничен конкретно, и наиболее предпочтительным является антитело, имеющее Fc-область, в которой любая из аминокислот в положениях 235 и 236 заменена на аргинин.

Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к варианту антитела, который обладает некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает его перспективным кандидатом для путей применения, для которых является важным время полужизни антитела *in vivo*, однако некоторые эффекторные функции (такие как комплемент и ADCC) не являются необходимыми или являются вредными. Можно осуществлять анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo* для подтверждения снижения/истощения CDC- и/или ADCC-активности. Например, можно осуществлять анализы

связывания Fc-рецептора (FcR) для гарантии того, что у антитела отсутствует способность к связыванию с Fc-гамма R (и поэтому, вероятно, отсутствует ADCC-активность), но сохраняется способность связываться с FcRn. Первичные клетки, опосредующие ADCC, т.е. NK-клетки, экспрессируют только Fc-гамма RIII, в то время как моноциты экспрессируют Fc-гамма RI, Fc-гамма RII и Fc-гамма RIII. Данные об экспрессии FcR на гематopoэтических клетках обобщены в таблице 3 на с. 464 у Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9, 1991, сс. 457-492. Примерами анализов *in vitro* ADCC-активности представляющей интерес молекулы являются (но не ограничиваясь только ими) анализы, описанные в патенте США № 5500362 (см., например, Hellstrom и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1986, сс. 7059-7063 и Hellstrom и др., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82, 1985, сс. 1499-1502); патенте США № 5821337 (см. Bruggemann и др., *J. Exp. Med.* 166, 1987, сс. 1351-1361). В альтернативном варианте можно применять нерадиоактивные методы анализа (см., например, нерадиоактивный анализ цитотоксичности АСТИ® на основе проточной цитометрии (фирма CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью, шт. Калифорния); и нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96® (фирма Promega, Мэдисон, шт. Висконсин). Пригодными для таких анализов эффекторными клетками являются мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и естественные клетки-киллеры (NK). В альтернативном или дополнительном варианте ADCC-активность представляющей интерес молекулы можно оценивать *in vivo*, например, на животной модели, например, как описано у Clynes и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1998, сс. 652-656. Можно осуществлять также анализы связывания C1q для подтверждения того, что антитело не может связывать C1q и поэтому у него отсутствует CDC-активность (см., например, описание ELISA для оценки связывания C1q и C3c в WO 2006/029879 и WO 2005/100402). Для оценки активации комплемента можно осуществлять анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro и др., *J. Immunol. Methods* 202, 1996, сс. 163-171; Cragg и др., *Blood* 101, 2003, сс. 1045-1052; и Cragg, *Blood* 103, 2004, сс. 2738-2743).

30 Определение FcRn-связывания и клиренса/времени полужизни *in vivo* можно осуществлять также с использованием методов, известных в данной области (см., например, Petkova S.B. и др., *Int'l. Immunol.* 18(12), 2006, сс. 1759-1769).

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, указанное в настоящей заявке, представляет собой антитело, в котором константная область антитела содержит константную область Н-цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 45, и константную область L-цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 23.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антитело, содержащее тяжелую цепь (Н-цепь) и легкую цепь (L-цепь), выбранную из группы, которая состоит из цепей, указанных ниже в подпунктах 1)-6):

1) Н-цепь и L-цепь, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 66 и 67 соответственно;

2) Н-цепь и L-цепь, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 68 и 69 соответственно;

3) Н-цепь и L-цепь, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 70 и 71 соответственно;

4) Н-цепь и L-цепь, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 72 и 73 соответственно;

5) Н-цепь и L-цепь, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 74 и 75 соответственно; и

6) Н-цепь и L-цепь, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 76 и 77 соответственно.

(a7) Другие варианты осуществления изобретения

(Варианты антител)

Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к вариантам аминокислотных последовательностей антител, представленных в настоящем описании. Например, может требоваться повышать аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела можно получать путем интродукции соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем синтеза пептидов. Указанные модификации включают, например, делеции и/или инсерции, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Для получения конечной конструкции можно использовать любую комбинацию делеций, инсерций и

замен, при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками, например, способностью связываться с антигеном.

a7-1) Полученные путем замены, инсерции и делеции варианты

Некоторыми вариантами осуществления изобретения являются варианты антител, которые имеют одну или несколько аминокислотных замен. Сайты, представляющие интерес для замещающего мутагенеза, включают HVR и FR. Консервативные замены представлены ниже в таблице А под заголовком «предпочтительные замены», и они описаны ниже со ссылкой на классы боковых цепей аминокислот. Более важные замены представлены ниже в таблице А под заголовком «приведенные в качестве примера замены». Аминокислотные замены можно интродуцировать в представляющее интерес антитело и продукты подвергать скринингу в отношении требуемой активности, например, сохранения/повышения способности к связыванию антигена, пониженной иммуногенности или улучшенной ADCC или CDC.

15 Таблица А

Исходный остаток	Приведенные в качестве примера замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Аминокислоты можно группировать на основе общих свойств боковых цепей следующим образом: (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) кислотные: Asp, Glu; (4) основные: His, Lys, Arg; (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro; (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Под неконсервативными заменами подразумевают замену представителя одного из указанных классов на представителя из другого класса.

Один из типов полученного в результате замены варианта включает замену одного или нескольких остатков гипервариабельного участка родительского антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела). Как правило, полученный(ые) в результате вариант(ы), отобранный(ые) для дополнительного исследования, должен(ы) иметь модификации (например, улучшения) некоторых биологических свойств (например, повышенную аффинность, пониженную иммуногенность) относительно родительского антитела, и/или должен(ы) иметь практически сохраненные определенные биологические свойства родительского антитела. Примером полученного в результате замены варианта является антитело с созревшей аффинностью, которое можно создавать, например, с использованием технологий созревания аффинности на основе фагового дисплея, например, указанных в настоящем описании. В целом, метод состоит в следующем: один или несколько остатков HVR подвергают мутации и варианты антител экспонируют на фаге и подвергают скринингу в отношении конкретной биологической активности (например, аффинности связывания).

Изменения (например, замены) можно осуществлять в HVR, например, для повышения аффинности антитела. Указанные изменения можно делать в «горячих (активных) точках» в HVR, т.е. остатках, кодируемых кодонами, которые с высокой частотой подвергаются мутации в процессе соматического созревания (см., например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207, 2008, сс. 179-196), и/или в остатках, которые контактируют с антигеном, с последующим тестированием варианта VH или VL в отношении аффинности связывания. Созревание аффинности путем создания и повторной селекции из вторичных библиотек описано, например, у Hoogenboom и др., *Methods in Molecular Biology* 178, 2002, сс. 1-37. В некоторых вариантах осуществления процесса созревания аффинности интродуцируют разнообразие в гены вариабельной области, выбранные для созревания, с помощью любого из широкого разнообразия методов (например, ПЦР пониженной точности, перестановка цепи или сайтнаправленный мутагенез с использованием олигонуклеотидов). Затем создают вторичную библиотеку. Затем библиотеку подвергают скринингу для

идентификации любых вариантов антител с требуемой аффинностью. Другой метод, применяемый для интродукции разнообразия, включает подходы, мишенью которых является HVR, при которых рандомизируют несколько остатков HVR (например, одновременно 4-6 остатков). Остатки HVR, участвующие в связывании антигена, можно специфически идентифицировать, например, используя аланин-сканирующий мутагенез или моделирование. Так, мишенями являются, прежде всего, CDR-H3 и CDR-L3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения замены, инсерции или делеции могут затрагивать один или несколько HVR, если указанные изменения не снижают существенно способность антитела связываться с антигеном. Например, в HVR могут быть сделаны консервативные изменения (например, консервативные замены, указанные в настоящем описании), которые не снижают существенно аффинность связывания. Указанные изменения, например, могут находиться вне принимающих участие в контактировании с антигеном остатков HVR. В некоторых вариантах осуществления изобретения в последовательностях вариантов VH и VL, указанных выше, каждый HVR либо является неизменным, либо содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

Ценным методом идентификации остатков или областей антитела, которые можно подвергать мутагенезу, является так называемый «аланин-сканирующий мутагенез», описанный у Cunningham и Wells, Science 244, 1989, сс. 1081-1085. При осуществлении этого метода остаток или группу остатков-мишеней (например, заряженные остатки, такие как Arg, Asp, His, Lys и Glu) идентифицируют и заменяют на нейтральную или отрицательно заряженную аминокислоту (например, аланин или полиаланин) для решения вопроса о том, будет ли это влиять на взаимодействие антитела с антигеном. Дополнительные замены можно интродуцировать в те положения аминокислот, для которых продемонстрирована функциональная чувствительность к начальным заменам. В альтернативном или дополнительном варианте анализируют кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между антителом и антигеном. Указанные контактирующие остатки и соседние остатки можно рассматривать в качестве мишеней или исключать из рассмотрения в качестве кандидатов для замены. Варианты можно подвергать

скринингу для решения вопроса о том, обладают ли они требуемыми свойствами.

Инсерции в аминокислотные последовательности включают амино- и/или карбоксиконцевые слияния, варьирующие по длине от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или большее количество остатков, а также инсерции одного или нескольких аминокислотных остатков внутрь последовательности. Примером результата осуществления концевых инсерций является антитело с N-концевым метионильным остатком. Другие инсерционные варианты молекул антител включают слияние N- или C-концов антитела с ферментом (например, для ADEPT (антитело-направляемый фермент пролекарственной терапии) или полипептидом, который удлиняет время полужизни антитела в сыворотке.

а7-2) Варианты гликозилирования

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, изменяют с целью повышения или понижения степени гликозилирования антитела. Добавление или делецию сайтов гликозилирования в антителе можно легко осуществлять путем такого изменения аминокислотной последовательности, которое позволяет создавать или удалять один или несколько сайтов гликозилирования.

Если антитело содержит Fc-область, то можно изменять присоединенный к ней углевод. Нативные антитела, которые продуцируются клетками млекопитающих, как правило, содержат разветвленный биантенный олигосахарид, который, как правило, присоединен с помощью N-связи к Asn297 CH2-домена Fc-области (см., например, Wright и др., TIBTECH 15, 1997, сс. 26-32). Олигосахарид может включать различные углеводы, например, маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в «стебле» биантенной олигосахаридной структуры. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификации олигосахарида в антителе, предлагаемом в изобретении, можно осуществлять для создания вариантов антитела с определенными улучшенными свойствами.

Одним из вариантов осуществления изобретения являются варианты антитела, имеющие углеводную структуру, в которой снижено содержание фукозы, присоединенной (прямо или косвенно) к Fc-области. Например,

содержание фукозы в указанной Fc-области может составлять от 1% до 80%, от 1% до 65%, от 5% до 65% или от 20% до 40%. Содержание фукозы определяют путем расчета среднего содержания фукозы в сахарной цепи на Asn297 относительно суммы всех гликоструктур, присоединенных к Asn297 (например, комплексных, гибридных структур и структур с высоким содержанием маннозы), которое измеряют с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии согласно методу, описанному, например, в WO 2008/077546. Asn297 обозначает остаток аспарагина, присутствующий примерно в положении 297 в Fc-области (EU-нумерация остатков Fc-области); однако вследствие минорных вариаций последовательности антитела Asn297 может располагаться также в положении, находящемся на расстоянии примерно ± 3 аминокислоты в прямом или обратном направлении от положения 297, т.е. между положениями 294 и 300. Указанные фукозилированные варианты могут обладать улучшенной ADCC-функцией (см., например, публикации патентов США US 2003/0157108 (Presta L.); US 2004/0093621 (фирма Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Примерами публикаций, касающихся «дефукозилированных» вариантов антител или вариантов антител «с дефицитом фукозы» являются: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki и др., J. Mol. Biol. 336, 2004, сс. 1239-1249; Yamane-Ohnuki и др., Biotech. Bioeng. 87, 2004, сс. 614-622). Примерами клеточных линий, которые обладают способностью продуцировать дефукозилированные антитела, являются Lec13 CHO-клетки с дефицитом белкового фукозилирования (Ripka и др., Arch. Biochem. Biophys. 249, 1986, сс. 533-545; US 2003/0157108 (Presta L.) и WO 2004/056312 (Adams и др., см., прежде всего, пример 11), и клеточные линии с «выключенным» геном, например, CHO-клетки с «выключенным» геном альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8 (см., например, Yamane-Ohnuki и др., Biotech. Bioeng. 87, 2004, сс. 614-622); Kanda и др., Biotechnol. Bioeng., 94(4), 2006, сс. 680-688; и WO 2003/085107).

Кроме того, описаны варианты антител с бисекционными олигосахаридами, например, в которых биантенный олигосахарид, присоединенный к Fc-области

антитела, бисекционнируется с помощью GlcNAc. Указанные варианты антител могут отличаться пониженным фукозилированием и/или повышенной ADCC-функцией. Примеры указанных вариантов антител описаны, например, в WO 2003/011878 (Jean-Mairet и др.); патенте США № 6602684 (Umana и др.) и US 2005/0123546 (Umana и др.). Предложены также варианты антител по меньшей мере с одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc-области. Указанные варианты антител могут обладать повышенной CDC-функцией. Указанные варианты антител описаны, например, в WO 1997/30087 (Patel и др.); WO 1998/58964 (Raju S.); и WO 1999/22764 (Raju S.).

10 а7-3) Варианты антител, сконструированные с помощью цистеина

В некоторых вариантах осуществления изобретения может оказаться желательным создавать антитела, сконструированные с помощью цистеина, например, «тиоМАТ», в которых один или несколько остатков в антителе заменены на остатки цистеина. В конкретных вариантах осуществления изобретения замененные остатки находятся в доступных сайтах антитела. Путем замены этих остатков на цистеин реакционноспособные тиольные группы помещаются в доступные сайты антитела и могут использоваться для конъюгации антитела с другими фрагментами, такими как фрагменты, представляющие собой лекарственное средство, или фрагменты, представляющие собой линкер, связанный с лекарственным средством, с созданием иммуноконъюгата, указанного ниже в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения любой(ые) один или несколько следующих остатков может(гут) быть заменен(ы) на цистеин: V205 (нумерация по Кэботу) легкой цепи; A118 (EU-нумерация) тяжелой цепи и S400 (EU-нумерация) Fc-области тяжелой цепи. Антитела, сконструированные с помощью цистеина, можно создавать согласно методу, например, описанному в патенте США № 7521541.

25 а7-4) Производные антител

30 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, можно дополнительно модифицировать таким образом, чтобы оно содержало дополнительные небелковые фрагменты, известные в данной области и легко доступные. Фрагменты, пригодные для дериватизации антитела, включают (но не ограничиваясь только ими)

водорастворимые полимеры. Примерами водорастворимых полимеров являются (но не ограничиваясь только ими) полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры) и декстран- или поли(*n*-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры пропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси.

10 Полиэтиленгликольпропиональдегид может иметь преимущество при производстве благодаря его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, присоединенных к антителу, может варьироваться и, если присоединено более одного полимера, то они могут представлять собой

15 одинаковые или различные молекулы. В целом, количество и/или тип полимеров, применяемых для дериватизации, можно определять с учетом таких особенностей (но не ограничиваясь только ими), как конкретные свойства или функции антитела, подлежащие усовершенствованию, предполагается ли применение производного антитела в терапии в определенных условиях, и т.д.

20 Другим вариантом осуществления изобретения являются конъюгаты антитела и небелкового фрагмента, которые можно избирательно нагревать, воздействуя на них излучением. В одном из вариантов осуществления изобретения небелковый фрагмент представляет собой углеродную нанотрубку (Kam и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 2005, сс. 11600-11605). Излучение

25 может иметь любую длину волны и включает (но не ограничиваясь только ими) длины волн, которые не повреждают обычные клетки, но которые нагревают небелковый фрагмент до температуры, при которой уничтожаются клетки, ближайшие к конъюгату: антитело-небелковый фрагмент.

Б. Методы рекомбинации и композиции

30 Антитела можно получать, используя методы рекомбинации и композиции, например, описанные в патенте США № 4816567. Одним из вариантов осуществления изобретения является выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против C1s, представленное в настоящем описании.

Указанная нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL, и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкие и/или тяжелые цепи антитела). Следующим вариантом осуществления изобретения является(ются) один или несколько векторов (например, экспрессионных векторов), который(е) содержит(ат) указанную нуклеиновую кислоту. Еще одним вариантом осуществления изобретения является клетка-хозяин, которая содержит указанную нуклеиновую кислоту. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин содержит (например, в результате трансформации указанными векторами): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, например, клетку яичника китайского хомячка (CHO) или лимфоидную клетку (например, Y0-, NS0-, Sp20-клетку). Одним из вариантов осуществления изобретения является способ получения антитела против C1s, заключающийся в том, что культивируют клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело, описанное выше, в условиях, пригодных для экспрессии антитела, и необязательно выделяют антитело из клетки-хозяина (или среды для культивирования клетки-хозяина).

Для рекомбинантного получения антитела против C1s нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, описанное выше, выделяют и встраивают в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Указанную нуклеиновую кислоту легко можно выделять и секвенировать с использованием общепринятых процедур (например, путем использования олигонуклеотидных зондов, которые обладают способностью специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

Приемлемые клетки-хозяева для клонирования или экспрессии кодирующих антитело векторов включают прокариотические или эукариотические клетки, представленные в настоящем описании. Например, антитела можно получать в бактериях, в частности, когда не требуется гликозилирование и связанная с Fc эффекторная функция. Сведения об экспрессии фрагментов антитела и полипептидов в бактериях см. например, в патентах США №№ 5648237, 5789199 и 5840523 (см. также у Charlton в: *Methods in Molecular Biology*, под ред. Lo В.К.С., изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 245-254 описание экспрессии фрагментов антител в *E. coli*.) После экспрессии антитело можно выделять из пасты бактериальных клеток в виде растворимой фракции и можно дополнительно очищать.

Помимо прокариотических организмов в качестве хозяев, пригодных для клонирования или экспрессии векторов, которые кодируют антитела, можно использовать эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были «гуманизированы», что позволяет получать антитело с частично или полностью человеческой схемой гликозилирования (см. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22, 2004, сс. 1409-1414 и Li и др., *Nat. Biotech.* 24, 2006, сс. 210-215).

Клетки-хозяева, которые можно использовать для экспрессии гликозилированного антитела, получают также из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных животных). Примерами клеток беспозвоночных являются клетки насекомых, а также можно применять клетки растений. Были выявлены многочисленные штаммы бакуловирусов и соответствующие пригодные для них в качестве хозяев клетки насекомых, прежде всего для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

В качестве хозяев можно применять также культуры растительных клеток (см., например, патенты США №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описание технологии PLANTIBODIES® для получения антител в трансгенных растениях)).

В качестве хозяев можно применять также клетки позвоночных. Например, можно использовать клеточные линии млекопитающих, которые адаптированы к росту в суспензии. Другими примерами приемлемых линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия клеток почки обезьяны CV1,

трансформированная с помощью OB40 (COS-7); линия клеток почки эмбриона человека (HEK 293-клетки или клетки линии 293, описанные, например, у Graham и др., *J. Gen. Virol.*, 36, 1977, с. 59); клетки почки детеныша хомяка (ВНК); клетки Сертоли мыши (ТМ4-клетки, описанные, например, у Mather, *Biol. Reprod.*, 23, 1980, сс. 243-251); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76,); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени бычьей крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (ММТ 060562); клетки TRI, описанные, например, у Mather и др., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383, 1982, сс. 44-68); клетки MRC 5 и клетки FS4. Другими ценными линиями клеток-хозяев млекопитающих являются клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая DHFR⁻-CHO-клетки (Urlaub и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1980, с. 4216); и клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор конкретных линий клеток-хозяев млекопитающих, которые можно применять для производства антител, см., например, у Yazaki и Wu, в: *Methods in Molecular Biology* под ред. В.К.С. Lo, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 255-268.

Антитела с рН-зависимыми характеристиками можно получать с помощью методов скрининга и/или методов мутагенеза, например, описанных в WO 2009/125825. Методы скрининга могут включать любой процесс, с помощью которого идентифицируют антитело с рН-зависимыми характеристиками связывания в популяции антител, специфических для конкретного антигена. В некоторых вариантах осуществления изобретения методы скрининга могут предусматривать измерение одного или нескольких параметров связывания (например, KD или kd) индивидуальных антител в исходной популяции антител как при кислом, так и при нейтральном значении рН. Параметры связывания антител можно измерять, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса или любого другого аналитического метода, который позволяет количественно или качественно оценивать характеристики связывания антитела с конкретным антигеном. В некоторых вариантах осуществления изобретения методы скрининга могут предусматривать идентификацию антитела, связывание которого с антигеном характеризуется соотношением KD при кислом/нейтральном значении рН, составляющим 2 или более. Альтернативно

этому, методы скрининга могут предусматривать идентификацию антитела, связывание которого с антигеном характеризуется соотношением k_d при кислом/нейтральном значении pH, составляющим 2 или более.

В другом варианте осуществления изобретения методы мутагенеза могут предусматривать делецию, замену или добавление аминокислоты в тяжелую и/или легкую цепь антитела для усиления pH-зависимого связывания антитела с антигеном. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутагенезу можно подвергать один или несколько переменных доменов антитела, например, один или несколько HVR (например, CDR). Например, мутагенез может приводить к замене аминокислоты в одном или нескольких HVR (например, CDR) антитела на другую аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутагенез может приводить к замене одной или нескольких аминокислот по меньшей мере в одном HVR (например, CDR) антитела на гистидин. В некоторых вариантах осуществления изобретения «усиленное pH-зависимое связывание» означает, что мутантная версия антитела характеризуется более высоким соотношением K_D при кислом/нейтральном значении pH, или более высоким соотношением k_d при кислом/нейтральном значении pH, чем исходная «родительская» (т.е. в меньшей степени зависящая от pH) версия антитела до мутагенеза. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантная версия антитела характеризуется соотношением K_D при кислом/нейтральном значении pH, составляющим 2 или более. Альтернативно этому, мутантная версия антитела характеризуется соотношением k_d при кислом/нейтральном значении pH, составляющим 2 или более.

Поликлональные антитела предпочтительно продуцируются у животных после нескольких подкожных (sc) или внутрибрюшинных (ip) инъекций релевантного антитела и адъюванта. Можно конъюгировать релевантный антиген с белком, иммуногенным для подлежащего иммунизации вида, например, гемоцианином лимфы улитки, сывороточным альбумином, бычьим тироглобулином или соевым ингибитором трипсина, с использованием бифункционального или дериватирующего агента, например, сложного сульфосукцинимидного эфира малеимидобензоила (конъюгация через остатки цистеина), N-гидроксисукцинимиды (конъюгация через остатки лизина),

глутарового альдегида, янтарного ангидрида, SOCl_2 или $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, где R и R^1 обозначают различные алкильные группы.

Животных (как правило, млекопитающих кроме человека) иммунизируют с использованием антигена, иммуногенных конъюгатов или производных путем объединения, например, 100 мкг или 5 мкг белка или конъюгата (для кроликов и мышей соответственно) с 3 объемами полного адъюванта Фрейнда, и осуществляют введение раствора внутрикожно в несколько мест. Через 1 месяц животных подвергают бустерной вакцинации (ревакцинации) с использованием от 1/5 до 1/10 исходного количества пептида или конъюгата в полном адъюванте Фрейнда путем подкожной инъекции в несколько мест. Через 7-14 дней получают образцы крови животных и оценивают в сыворотке титр антитела. Животных подвергают ревакцинации вплоть до выхода титра на плато. Предпочтительно животных ревакцинируют с использованием конъюгата, в который входит тот же антиген, но конъюгированный с другим белком и/или через другой перекрестносшивающий реагент. Конъюгаты можно получать также в рекомбинантной клеточной культуре в виде белковых слияний. Кроме того, агрегирующие агенты, такие как квасцы, можно применять для усиления иммунного ответа.

Моноклональные антитела получают из популяции практически гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, входящие в популяцию, идентичны за исключением возможных встречающихся в естественных условиях мутаций и/или пост-трансляционных модификаций (например, изомеризации, амидирования), которые могут присутствовать в минорных количествах. Прилагательное «моноклональный» свидетельствует о том, что антитело не присутствует в смеси различных антител.

Например, моноклональные антитела можно получать, используя метод гибридом, впервые описанный Kohler и др., Nature 256(5517), 1975, сс. 495-497. При осуществлении метода гибридом мышью или другое пригодное в качестве хозяина животное, такое как хомяк, иммунизируют согласно описанному выше методу для выработки лимфоцитов, которые продуцируют или обладают способностью продуцировать антитела, специфически связывающиеся с белком, применяемым для иммунизации. Альтернативно этому, лимфоциты можно иммунизировать *in vitro*.

Иммунизирующий агент должен, как правило, включать антигенный белок или его слитый вариант. Как правило, применяют либо лимфоциты периферической крови (PBL), если требуются клетки человеческого происхождения, либо применяют селезеночные клетки или клетки лимфатических узлов, если источниками являются млекопитающие кроме человека. Затем лимфоциты сливают с иммортализованной клеточной линией с помощью приемлемого агента для слияния, такого как полиэтиленгликоль, с получением клетки гибридомы (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, изд-во Academic Press, 1986, сс. 59-103).

Иммортализованные клеточные линии, как правило, представляют собой трансформированные клетки млекопитающих, прежде всего клетки миеломы грызунов, быков и человека. Как правило, применяют крысиные или мышинные клеточные линии миеломы. Полученные таким образом клетки гибридомы высевают и выращивают в приемлемой культуральной среде, которая предпочтительно содержит одну или несколько субстанций, которые ингибируют рост или выживание неслитых родительских клеток миеломы. Например, если в родительских клетках миеломы отсутствует фермент гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), то культуральная среда для гибридом, как правило, включает гипоксантин, аминоптерин и тимидин (HAT-среда), т.е. субстанции, которые препятствуют росту клеток с дефицитом HGPRT.

Предпочтительными иммортализованными клетками миеломы являются клетки, которые можно эффективно сливать, которые поддерживают стабильный высокий уровень производства антитела отобранными антителопродуцирующими клетками и обладают чувствительностью к среде, такой как HAT-среда. Среди них предпочтительными являются мышинные линии миеломы, например, полученные из мышинных опухолей MOPC-21 и MPC-11, которые можно получать от фирмы Salk Institute Cell Distribution Center, Сан-Диего, шт. Калифорния, США, и SP-2-клетки (и их производные, например, X63-Ag8-653), которые можно получать из Американской коллекции типовых культур, Манассас, шт. Вирджиния, США. Также описаны клеточные линии человеческой миеломы и мышинной-человеческой гетеромиеломы, которые можно применять для производства человеческих моноклональных антител

(Kozbor и др., J. Immunol. 133(6), 1984, сс. 3001-3005; Brodeur и др., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, изд-во Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, сс. 51-63).

5 Культуральную среду, в которой выращивают клетки гибридомы, оценивают в отношении производства моноклональных антител против антигена. Предпочтительно специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридомы, определяют с помощью иммунопреципитации или анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммуноанализ (РИА) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Указанные методики и анализы известны в данной области. Например, 10 аффинность связывания можно определять с помощью анализа Скэтчарда, описанного у Munson, Anal. Biochem. 107(1), 1980, сс. 220-239.

 После того, как установлено, что клетки гибридом продуцируют антитела требуемой специфичности, аффинности и/или активности, клоны можно 15 субклонировать, используя процедуры серийного разведения, и выращивать с помощью стандартных методов (Goding, выше). Приемлемые для этой цели культуральные среды включают, например, среду D-MEM или RPMI-1640. Кроме того, клетки гибридомы можно выращивать *in vivo* в виде опухолей в млекопитающих.

20 Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, можно отделять от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки с помощью общепринятых процедур очистки иммуноглобулинов, таких, например, как хроматография на белок А-сефарозе, гидроксипатите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

25 III. Анализы

 Представленные в настоящем описании антитела против C1s можно идентифицировать, осуществлять их скрининг или характеризовать их физические/химические свойства и/или виды биологической активности с помощью различных анализов, известных в данной области.

30 A. Анализы связывания и другие анализы

 Согласно одному из объектов изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, тестируют в отношении антигенсвязывающей активности с использованием известных методов, таких как ELISA, Вестерн-блоттинг и т.д.

Согласно другому объекту изобретения можно использовать анализы в условиях конкуренции для идентификации антитела, которое конкурирует за связывание с C1s с любым антителом против C1s, представленным в настоящем описании, или для идентификации антитела, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело против C1s, представленное в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения, когда указанное конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно блокирует (например, снижает) связывание референс-антитела с C1s по меньшей мере на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанное конкурирующее антитело связывается с таким же эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), с которым связывается антитело против C1s, представленное в настоящем описании. Подробное описание приведенных в качестве примера методов картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлено у Morris, "Epitope Mapping Protocols", в: Methods in Molecular Biology, т. 66, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, 1996.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанные анализы в условиях конкуренции можно осуществлять при нейтральном значении pH. В некоторых вариантах осуществления изобретения анализ в условиях конкуренции представляет собой тандемный конкурентный анализ с использованием, например, систем Octet®.

В качестве примера анализа в условиях конкуренции иммобилизованный C1s инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, которое связывается с C1s (например одно из антител, указанных в настоящем описании), и второе немеченое антитело, подлежащее тестированию в отношении его способности конкурировать с первым антителом за связывание с C1s. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный C1s инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не второе немеченое антитело. После инкубации в условиях, приемлемых для связывания первого антитела с C1s, избыток несвязанного антитела удаляют и измеряют количество метки, ассоциированной с иммобилизованным C1s. Если количество метки, ассоциированной с иммобилизованным C1s, существенно снижается в тестируемом образце по

сравнению с контрольным образцом, то это свидетельствует о том, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с C1s (см., например, Harlow и Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, глава 14, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988).

5 В другом объекте изобретения антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело против C1s, представленное в настоящем описании, или которое конкурирует за связывание с C1s с антителом против C1s, представленным в настоящем описании, можно идентифицировать с помощью сэндвич-анализов. Сэндвич-анализы включают применение двух антител, каждое
10 из которых обладает способностью связываться с различным иммуногенным участком или эпитопом белка, подлежащего обнаружению. При осуществлении сэндвич-анализа тестируемый образец, представляющий собой аналит, связывается первым антителом, иммобилизованным на твердой подложке, а затем второе антитело связывается с аналитом, образуя тем самым
15 нерастворимый состоящий из трех компонентов комплекс (см. David и Greene, патент США № 4376110). Само второе антитело можно метить в помощью поддающегося обнаружению фрагмента (прямые сэндвич-анализы) или его можно оценивать с помощью антитела к иммуноглобулину, меченного с помощью поддающегося обнаружению фрагмента (непрямой сэндвич-анализ).
20 Например, одним из типов сэндвич-анализа является ELISA-анализ, в случае которого поддающийся обнаружению фрагмент представляет собой фермент. Антитело, которое связывается с C1s одновременно с антителом против C1s, представленным в настоящем описании, можно рассматривать как антитело, которое связывается с эпитопом, отличным от эпитопа антитела против C1s.
25 Таким образом, антитело, которое не связывается с C1s одновременно с антителом против C1s, представленным в настоящем описании, можно рассматривать как антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело против C1s или которое конкурирует за связывание с C1s с антителом против C1s.

30 Б. Анализы активности

Одним из объектов изобретения являются анализы, предназначенные для идентификации антител против C1s, которые обладают биологической активностью. Биологическая активность может включать блокирование

активации классического пути и образование продуктов расщепления в результате активации указанного пути, таких как C2a, C2b, C3a, C3b, C4a, C4b, C5a и C5b. Предложены также антитела, обладающие указанной биологической активностью *in vivo* и/или *in vitro*.

5 В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, тестируют в отношении указанной биологической активности. В некоторых вариантах осуществления изобретения у антитела, предлагаемого в изобретении, можно оценивать способность ингибировать опосредуемый комплементом гемолиз овечьих эритроцитов (RBC), которые
10 были сенсibilизированы антителами против антигенов овечьих RBC, т.е. с использованием RBC-анализа. В некоторых вариантах осуществления изобретения у антитела, предлагаемого в изобретении, можно оценивать способность ингибировать опосредуемый комплементом гемолиз куриных эритроцитов (cRBC), которые были сенсibilизированы антителами против
15 антигенов cRBC. С использованием человеческой сыворотки в качестве источника белков комплемента активность антитела, предлагаемого в изобретении, можно определять, измеряя количество высвободившегося гемоглобина с помощью спектрофотометрического метода.

RBC-анализ можно осуществлять с использованием известных методов,
20 таких как метод, описанный в J. Vis. Exp. (37), 2010, с. 1923. В указанной статье описано, как проводить анализ 50%-ной гемолитической способности комплемента (CH50) в виде анализа лизиса RBC. В целом, указанный анализ позволяет осуществлять измерение активации классического пути комплемента и обнаруживать снижение, отсутствие или инактивацию любого компонента
25 пути. Он позволяет оценивать активность компонентов комплемента в сыворотке в отношении лизиса эритроцитов. Когда антитело инкубируют с тестируемой сывороткой, путь активируется и вызывает гемолиз. Если уровень одного или нескольких из компонентов классического пути снижается, то величина CH50 снижается. Анализ CH50 не является точно таким же, что и
30 анализ, используемый в примерах, представленных в настоящем описании, в котором измеряют по существу % ингибирования лизиса клеток компонентами комплемента; однако концепция и базовая установка фактически такие же, как указанные в настоящем изобретении. В одном из вариантов осуществления

изобретения RBC-анализ осуществляют следующим образом. Человеческую сыворотку предварительно инкубируют с представляющим интерес антителом (например, в течение 3 ч при 37 градусах Цельсия (°C)). Затем сыворотку добавляют к такому же объему сенсibilизированных овечьих эритроцитов и инкубируют (например, в течение 1 ч при 37°C), давая осуществляться лизису эритроцитов. Затем реакцию прекращают. Смесь центрифугируют с получением дебриса нелизированных клеток и супернатант отбрасывают, анализ высвободившегося гемоглобина оценивают на основе абсорбции (ОП) при 415 нм. Для расчета процента (%) ингибирования лизиса эритроцитов за 0%-ное ингибирование принимают вариант, в котором не добавляют антитело (только буфер), а за 100%-ное ингибирование принимают вариант, в котором добавляют EDTA в конечной концентрации 5мМ (см. пример 7). Если для антитела обнаружен определенный процент (%) ингибирования эритроцитов, то это означает, что антитело обладает нейтрализующей активностью в отношении комплемента человеческой сыворотки, например, активностью в отношении ингибирования взаимодействия между C1q и комплексом C1r2s2.

Таким образом, RBC-анализ можно применять для оценки нейтрализующей активности антитела в отношении комплемента человеческой сыворотки для определения способности ингибировать взаимодействие между C1q и комплексом C1r2s2. Одним из вариантов осуществления настоящего изобретения является выделенное антитело, которое ингибирует взаимодействие между C1q и комплексом C1r2s2, где антитело обладает нейтрализующей активностью в отношении комплемента человеческой сыворотки на уровне по меньшей мере 70% при оценке с помощью RBC-анализа.

25 В. Оценка иммуногенного потенциала

Иммуногенный потенциал антител оценивают с использованием такого показателя, как обнаруженная до активной пролиферации доля секретирующих IL-2 CD4⁺ Т-клеток, согласно WO 2018/124005 (Kubo С. и др.). В частности, получают CD8⁻CD25^{low} РВМС (моноклеарные клетки периферической крови) из человеческих РВМС, и клетки культивируют в течение 67 ч в присутствии антител.

IV. Иммуноконъюгаты

Некоторыми вариантами осуществления изобретения являются иммуноконъюгаты, содержащие антитело против C1s, представленное в настоящем описании, конъюгированное с одним или несколькими
5 цитотоксическими агентами, такими как химиотерапевтические агенты или лекарственные средства, ингибирующие рост агенты, токсины (например, белковые токсины, обладающие ферментативной активностью токсины бактериального, грибного, растительного или животного происхождения или их фрагменты) или радиоактивные изотопы.

10 В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), в котором антитело конъюгировано с одним или несколькими лекарственными средствами, включая (но не ограничиваясь только ими) майтансиноид (см. патенты США №№ 5208020, 5416064 и EP 0425235 B1); ауристин, например,
15 фрагменты DE и DF монометилауристатина (ММАЕ и ММАФ) (см. патенты США №№ 5635483, 5780588 и 7498298); доластатин; калихеамицин или его производные (см. патенты США №№ 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001 и 5877296; Hinman и др., Cancer Res. 53, 1993, сс. 3336-3342; и Lode и др., Cancer Res. 58, 1998, сс. 2925-2928); антрациклин, такой
20 как дауномицин или доксорубин (см. Kratz и др., Curr. Med. Chem. 13, 2006, сс. 477-523; Jeffrey и др., Bioorg. Med. Chem. Lett. 16, 2006, сс. 358-362; Torgov и др., Bioconjug. Chem. 16, 2005, сс. 717-721; Nagy и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 2000, сс. 829-834; Dubowchik и др., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12, 2002, сс. 1529-1532; King и др., J. Med. Chem. 45, 2002, сс. 4336-4343; и патент США №
25 6630579); метотрексат; виндесин; таксан, такой как доцетаксел, паклитаксел, ларотаксел, тесетаксел и ортатаксел; трихотецен и CC1065.

В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит антитело, представленное в настоящем описании, конъюгированное с
обладающим ферментативной активностью токсином или его фрагментом,
30 включая (но не ограничиваясь только ими) А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, диантиновые белки, белки

Phytolaca americana (РАPI, РАPII и РАР -5), ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Sapaonaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены.

В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит антитело, представленное в настоящем описании, конъюгированное с радиоактивным атомом с образованием радиоконъюгата. Широкое разнообразие радиоактивных изотопов можно применять для получения радиоконъюгатов. Примеры включают ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb и радиоактивные изотопы Lu. Когда радиоконъюгат применяют для детекции, то он может содержать радиоактивный атом для скинтиграфических исследований, например, $\text{Tc}^{99\text{m}}$ или I^{123} , или спиновую метку для визуализации методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (известный также как магнитно-резонансная визуализация, МРВ), такую как йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Конъюгаты антитела и цитотоксического агента можно получать с использованием широкого разнообразия бифункциональных связывающих белки агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), имиотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметиладипимидат×HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бисазидопроизводные (такие как бис(*para*-азидобензоил)гександиамин), производные бисдиазония (такие как бис(*para*-дiazониумбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат), и обладающие двойной активностью фторсодержащие соединения (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин можно получать согласно методу, описанному у Vitetta и др., Science 238, 1987, сс. 1098-1104. Меченная с помощью C^{14} 1-изотиоцианатбензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является примером хелатирующего агента, применяемого для конъюгации радионуклеотида с антителом (см. WO 94/11026). Линкер может представлять собой «расщепляемый линкер», облегчающий высвобождение цитотоксического лекарственного средства. Например, можно использовать неустойчивый в

кислой среде линкер, чувствительный к действию пептидаз линкер, фотолabileный линкер, диметильный линкер или содержащий дисульфид линкер (Chari и др., Cancer Res. 52, 1992, сс. 127-131; патент США № 5208020).

В контексте настоящего описания под иммуноконъюгатами или ADC
5 подразумеваются (но не ограничиваясь только ими) указанные конъюгаты, полученные с использованием перекрестносшивающих реагентов, которые включают (но не ограничиваясь только ими) BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфид-EMCS, сульфид-GMBS, сульфид-KMUS, сульфид-MBS, сульфид-SIAB, сульфид-SMCC и
10 сульфид-SMPB, а также SVSB (сукцинимидил(4-винилсульфон)бензоат), которые поступают в продажу (например, от фирмы Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, шт. Иллинойс, США).

V. Способы и композиции для диагностирования и обнаружения

В некоторых вариантах осуществления изобретения любое из антител
15 против C1s, представленных в настоящем описании, можно применять для обнаружения присутствия C1s в биологическом образце. Понятие "обнаружение (детекция)" в контексте настоящего описания предусматривает количественное или качественное обнаружение. В конкретных вариантах осуществления изобретения биологический образец содержит клетку или ткань, например,
20 сыворотку, цельную кровь, плазму, полученный с помощью биопсии образец, образец ткани, клеточную суспензию, слюну, мокроту, оральную жидкость, спинномозговую жидкость, амниотическую жидкость, асцитную жидкость, молоко, молозиво, секрет молочных желез, лимфу, мочу, пот, слезную жидкость, желудочный сок, синовиальную жидкость, перитонеальную жидкость, жидкость
25 хрусталика глаза или слизь.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антитело против C1s, представленное в настоящем описании, для применения в способе диагностирования или обнаружения. Другой объект изобретения относится к способу обнаружения присутствия C1s в биологическом образце. В конкретных
30 вариантах осуществления изобретения способ заключается в том, что приводят в контакт биологический образец с антителом против C1s, представленным в настоящем описании, в условиях, обеспечивающих связывание антитела против C1s с C1s, и выявляют образование комплекса между антителом против C1s и

C1s. Указанный способ может представлять собой способ *in vitro* или *in vivo*. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против C1s применяют для отбора субъектов, которых можно лечить с помощью антитела против C1s, например, когда C1s является биомаркером для отбора пациентов.

5 Примеры нарушений, которые можно диагностировать с использованием антитела, предлагаемого в изобретении, включают (но не ограничиваясь только ими) возрастную макулярную дегенерацию, болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, анафилаксию, аргирофильную зернистость, артрит (например, ревматоидный артрит), астму, атеросклероз, атипичный гемолитико-уремический синдром, аутоиммунные заболевания, синдром Барракера-
10 Саймонса, болезнь Бехчета, амилоидную ангиопатию британского типа, буллезный пемфигоид, болезнь Бюргера, C1q-нефропатию, рак, катастрофический антифосфолипидный синдром, церебральную амилоидную ангиопатию, холодовую агглютининовую болезнь, кортикобазальную
15 дегенерацию, болезнь Крейтцфельдта-Якоба, болезнь Крона, криоглобулинемический васкулит, боксерское слабоумие, деменцию с тельцами Леви (DLB), диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, дискоидную красную волчанку, синдром Дауна, очаговый сегментарный гломерулосклероз, формальное расстройство мышления, лобно-височную
20 деменцию (FTD), лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, связанную с хромосомой 17, лобно-височную долевую дегенерацию, болезнь Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, синдром Гийена-Барре, болезнь Халлервордена-Шпатца, гемолитико-уремический синдром, наследственный ангионевротический отек, гипофосфатаз, синдром идиопатической пневмонии,
25 заболевания иммунного комплекса, миозит тела включения, инфекционное заболевание (например, заболевание, вызываемое бактериальными (например, *Neisseria meningitidis* или *Streptococcus*), вирусными (например, вирусом иммунодефицита человека (HIV)) или другими инфекционными агентами), воспалительное заболевание, ишемическое/реперфузионное повреждение,
30 умеренное когнитивное нарушение, иммунотромбоцитопеническую пурпуру (ИТР), дефицит кофактора молибдена (MoCD) типа А, мембранопролиферативный гломерулонефрит (MPGN) типа I, мембранопролиферативный гломерулонефрит (MPGN) типа II (болезнь плотных

отложений), мембранозный нефрит, мультиинфарктную деменцию, волчанку (например, системную красную волчанку (SLE)), гломерулонефрит, болезнь Кавасаки, мультифокальную двигательную нейропатию, рассеянный склероз, множественную системную атрофию, тяжелую миастению, инфаркт миокарда, миотоническую дистрофию, оптический нейромиелит, болезнь Ниманна-Пика типа С, негуаманское заболевание двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, болезнь Паркинсона, болезнь Паркинсона с деменцией, пароксизмальную ночную гемоглобинурию, пузырчатку обыкновенную, болезнь Пика, постэнцефалитический паркинсонизм, полимиозит, прионную белковую церебральную амилоидную ангиопатию, прогрессирующий подкорковый глиоз, прогрессирующий надъядерный паралич, псориаз, сепсис, Шига-токсин *E coli* (STEC)-HuS, спинальную мышечную атрофию, инсульт, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменцию с преобладанием нейрофибриллярных клубков, отторжение трансплантата, васкулит (например, ANCA-ассоциированный васкулит), гранулематоз Вегенера, серповидно-клеточную анемию, криоглобулинемию, смешанную криоглобулинемию, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, смешанную криоглобулинемию II типа, смешанную криоглобулинемию III типа, нефрит, медикаментозную тромбоцитопению, волчаночный нефрит, буллезный пемфигоид, приобретенный буллезный эпидермолиз, замедленную гемолитическую реакцию при переливании крови, синдром гипокплементарного крапивничного васкулита, псевдофакическую буллезную кератопатию и рефрактерность к переливанию тромбоцитов.

Некоторыми вариантами осуществления изобретения являются меченые антитела против C1s. Метки включают (но не ограничиваясь только ими) метки или фрагменты, которые можно обнаруживать непосредственно (такие как флуоресцентные, хромофорные, электронноплотные, хемилюминисцентные и радиоактивные метки), а также фрагменты, такие как ферменты или лиганды, которые подлежат косвенному обнаружению, например, посредством ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия. Примеры меток включают (но не ограничиваясь только ими) радиоизотопы ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H и ^{131}I , флуорофоры, такие как хелаты редкоземельных металлов или флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон, люциферазы,

например, люциферазу светляка и бактериальную люциферазу (патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофталазиндионы, пероксидазу из хрена (HRP), щелочную фосфатазу, β -галактозидазу, глюкоамилазу, лизоцим, оксидазы сахаридов, например, глюкозооксидаза, галактозооксидаза и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, гетероциклические оксидазы, такие как уриказа и ксантиноксидаза, сшитые с ферментом, который использует пероксид водорода для окисления предшественника красителя, такого как HRP, лактопероксидаза или микропероксидаза, биотин/авидин, спиновые метки, метки в виде бактериофагов, стабильные свободные радикалы и т.п.

10 VI. Фармацевтические композиции

Фармацевтические композиции антитела против C1s, представленные в настоящем описании, получают путем смешения указанного антитела, имеющего необходимую степень чистоты, с одним или несколькими необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е изд. под ред. Osol A., 1980) в форме лиофилизированных композиций или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители, как правило, являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях, они включают (но не ограничиваясь только ими): буферы, такие как фосфатный, цитратный буферы, а также буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол; бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и *мета*-крезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (содержащие менее приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поли(винилпирролидон); аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; содержащие металл комплексы (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные

вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). В контексте настоящего описания примеры фармацевтически приемлемых носителей включают также диспергирующие агенты интерстициальных лекарственных средств, такие как растворимые активные в нейтральной среде гликопротеины гиалуронидаз (sHASEGP), например, человеческие растворимые гликопротеины гиалуронидазы PH-20, такие как гHuPH20 (HYLENEX[®], фирма Baxter International, Inc.). Некоторые примеры sHASEGP и методы их применения, в том числе гHuPH20, описаны в публикациях патентов США №№ 2005/0260186 и 2006/0104968. Согласно одному из объектов изобретения sHASEGP объединяют с одним или несколькими дополнительными гликозаминогликаназами, такими как хондроитиназы.

Примеры лиофилизированных композиций антител описаны в патенте США № 6267958. Водные композиции антител включают композиции, описанные в патенте США № 6171586 и WO 2006/044908, последние композиции включают гистидин-ацетатный буфер.

Композиция, предлагаемая в изобретении, может содержать также более одного действующего вещества, если это необходимо для конкретного подлежащего лечению показания, предпочтительно вещества с дополнительными видами активности, которые не оказывают отрицательного воздействия друг на друга. Например, может требоваться дополнительно получать композицию, предназначенную для применения в комбинированной терапии. Такие действующие вещества должны присутствовать в комбинации в количествах, эффективных для достижения поставленной цели.

Действующие вещества можно включать также в микрокапсулы, например, полученные с помощью методов коацервации или межфазной полимеризации, например в гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы соответственно, в коллоидные системы введения лекарственного средства (например в липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е изд., под ред. Osol A., 1980.

Можно приготавливать препараты с замедленным высвобождением. Приемлемыми примерами препаратов с замедленным высвобождением являются

полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, включающие антитело или конъюгат, такие матрицы представляют собой изделия определенной формы, например, пленки или микрокапсулы.

Композиции, предназначенные для применения *in vivo*, как правило, должны быть стерильными. Стерильность можно легко обеспечивать, например, путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

VII. Терапевтические способы и композиции

Любое из антител против C1s, представленных в настоящем описании, можно применять в терапевтических способах.

Одним из объектов изобретения является антитело против C1s, представленное в настоящем описании, для применения в качестве лекарственного средства. Другими объектами изобретения является антитело против C1s, предназначенное для применения для лечения опосредуемого комплементом заболевания или нарушения. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является антитело против C1s, предназначенное для применения в способе лечения. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является антитело против C1s, предназначенное для применения в способе лечения индивидуума, который имеет опосредуемое комплементом заболевание или нарушение, включающем введение индивидууму в эффективном количестве антитела против C1s. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения способ включает введение дополнительно индивидууму в эффективном количестве по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства. «Индивидуум» в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения предпочтительно представляет собой человека.

Следующими вариантами осуществления изобретения является антитело против C1s, предназначенное для применения в способе лечения опосредуемого комплементом заболевания или нарушения. В следующих вариантах осуществления изобретения антитела против C1s можно применять для усиления клиренса C1s из плазмы. В следующих вариантах осуществления изобретения антитела против C1s можно применять для усиления клиренса C1r2s2 из плазмы. В следующих вариантах осуществления изобретения антитела против C1s можно применять для усиления клиренса C1r2s2, но не C1q из плазмы. В некоторых

случаях антитело ингибирует компонент классического пути комплемента; в некоторых случаях компонент классического пути комплемента представляет собой C1s. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является антитело против C1s, предназначенное для применения в способе лечения опосредуемого комплементом заболевания или нарушения. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является антитело против C1s, предназначенное для применения в способе усиления клиренса C1s из плазмы. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является антитело против C1s, предназначенное для применения в способе усиления клиренса C1r2s2 из плазмы. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является антитело против C1s, предназначенное для применения в способе усиления клиренса C1r2s2 из плазмы, но не C1q из плазмы. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является антитело против C1s, предназначенное для применения в способе ингибирования компонента классического пути комплемента; в некоторых случаях компонент классического пути комплемента представляет собой C1s. «Индивидуум» в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения предпочтительно представляет собой человека.

Одним из объектов настоящего изобретения является способ модуляции активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ представляет собой способ ингибирования активации комплемента, например, для снижения производства C4b2a. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен способ модуляции активации комплемента у индивидуума, имеющего опосредуемое комплементом заболевание или нарушение, где способ включает введение индивидууму антитела против C1s, представленного в настоящем описании, или фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем описании, где фармацевтическая композиция содержит антитело против C1s, представленное в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный способ представляет собой способ ингибирования активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуум представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуум представляет собой человека. Введение можно осуществлять с использованием любого пути, известного специалистам в данной

области, включая пути, указанные в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение представляет собой внутривенное или подкожное введение. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение представляет собой подоболочечное введение.

5 Опосредуемое комплементом заболевание или нарушение представляет собой расстройство, отличающееся аномальным количеством компонента комплемента C1s или аномальным уровнем протеолитической активности компонента комплемент C1s в клетке, ткани или жидкости индивидуума.

10 В некоторых случаях опосредуемое комплементом заболевание или нарушение, отличающееся присутствием в клетке, ткани или жидкости повышенного (превышающего нормальное) количества C1s или повышенного уровня активности компонента комплемента C1s. Например, в некоторых случаях опосредуемое комплементом заболевание или нарушение отличается присутствием в ткани головного мозга и/или спинномозговой жидкости
15 повышенного количества и/или повышенной активности C1s. Количество C1s, "превышающее нормальное" в клетке, ткани или жидкости, свидетельствует о том, что количество C1s в клетке, ткани или жидкости превышает нормальный контрольный уровень, например, превышает нормальный контрольный уровень, характерный для индивидуума или популяции индивидуумов такой же
20 возрастной группы. Уровень активности C1s, "превышающий нормальный", в клетке, ткани или жидкости, свидетельствует о том, что протеолитическое расщепление, осуществляемое C1s в клетке, ткани или жидкости, превышает нормальный контрольный уровень, например, нормальный контрольный уровень, характерный для индивидуума или популяции индивидуумов такой же
25 возрастной группы. В некоторых случаях индивидуум, имеющий опосредуемое комплементом заболевание или нарушение, имеет один или несколько дополнительных симптомов указанного заболевания или нарушения.

30 В других случаях опосредуемое комплементом заболевание или нарушение отличается присутствием в клетке, ткани или жидкости более низкого по сравнению с нормальным количеством C1s или более низкого уровня активности компонента комплемента C1s. Например, в некоторых случаях опосредуемое комплементом заболевание или нарушение отличается присутствием в ткани головного мозга и/или спинномозговой жидкости пониженного количества и/или

пониженной активности C1s. Количество C1s, "более низкое, чем нормальное" в клетке, ткани или жидкости, свидетельствует о том, что количество C1s в клетке, ткани или жидкости ниже нормального контрольного уровня, например, ниже, чем нормальный контрольный уровень, например, характерный для индивидуума или популяции индивидуумов такой же возрастной группы. Уровень активности C1s, "более низкий, чем нормальный", в клетке, ткани или жидкости, свидетельствует о том, что протеолитическое расщепление, осуществляемое C1s в клетке, ткани или жидкости, ниже, чем нормальный контрольный уровень, характерный для индивидуума или популяции индивидуумов такой же возрастной группы. В некоторых случаях индивидуум, имеющий опосредуемое комплементом заболевание или нарушение, имеет один или несколько дополнительных симптомов указанного заболевания или нарушения.

Опосредуемое комплементом заболевание или нарушение представляет собой заболевание или нарушение, при котором количество или активность компонента комплемента C1s является таким, что вызывает заболевание или нарушение у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изобретения опосредуемое комплементом заболевание или нарушение выбирают из группы, состоящей из аутоиммунного заболевания, рака, гематологического заболевания, инфекционного заболевания, воспалительного заболевания, ишемически-реперфузного повреждения, нейродегенеративного заболевания, нейродегенеративного нарушения, глазного заболевания, почечного заболевания, отторжения трансплантата, сосудистого заболевания и васкулита. В некоторых вариантах осуществления изобретения опосредуемое комплементом заболевание или нарушение представляет собой аутоиммунное заболевание. В некоторых вариантах осуществления изобретения опосредуемое комплементом заболевание или нарушение представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления изобретения опосредуемое комплементом заболевание или нарушение представляет собой инфекционное заболевание. В некоторых вариантах осуществления изобретения опосредуемое комплементом заболевание или нарушение представляет собой воспалительное заболевание. В некоторых вариантах осуществления изобретения опосредуемое комплементом заболевание или нарушение представляет собой гематологическое заболевание. В некоторых вариантах осуществления изобретения опосредуемое комплементом заболевание

или нарушение представляет собой ишемически-реперфузное повреждение. В некоторых вариантах осуществления изобретения опосредуемое комплементом заболевание или нарушение представляет собой глазное заболевание. В некоторых вариантах осуществления изобретения опосредуемое комплементом 5 заболевание или нарушение представляет собой почечное заболевание. В некоторых вариантах осуществления изобретения опосредуемое комплементом заболевание или нарушение представляет собой отторжение трансплантата. В некоторых вариантах осуществления изобретения опосредуемое комплементом 10 заболевание или нарушение представляет собой обусловленное антителом отторжение трансплантата. В некоторых вариантах осуществления изобретения опосредуемое комплементом заболевание или нарушение представляет собой сосудистое заболевание. В некоторых вариантах осуществления изобретения опосредуемое комплементом заболевание или нарушение представляет собой васкулитное нарушение. В некоторых вариантах осуществления изобретения 15 опосредуемое комплементом заболевание или нарушение представляет собой нейродегенеративное заболевание или нарушение. В некоторых вариантах осуществления изобретения опосредуемое комплементом заболевание или нарушение представляет собой нейродегенеративное заболевание. В некоторых вариантах осуществления изобретения опосредуемое комплементом заболевание 20 или нарушение представляет собой нейродегенеративное нарушение. В некоторых вариантах осуществления изобретения опосредуемое комплементом заболевание или нарушение представляет собой таупатию.

Примеры опосредуемого комплементом заболевания или нарушения включают (но не ограничиваясь только ими) возрастную макулярную 25 дегенерацию, болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, анафилаксию, аргирофильную зернистость, артрит (например, ревматоидный артрит), астму, атеросклероз, атипичный гемолитико-уремический синдром, аутоиммунные заболевания, синдром Барракера-Саймонса, болезнь Бехчета, амилоидную ангиопатию британского типа, буллезный пемфигоид, болезнь 30 Бюргера, С1q-нефропатию, рак, катастрофический антифосфолипидный синдром, церебральную амилоидную ангиопатию, холодовую агглютининовую болезнь, кортикобазальную дегенерацию, болезнь Крейтцфельда-Якоба, болезнь Крона, криоглобулинемический васкулит, боксерское слабоумие,

деменцию с тельцами Леви (DLB), диффузные нейрофибриллярные клубки. с кальцификацией, дискоидную красную волчанку, синдром Дауна, очаговый сегментарный гломерулосклероз, формальное расстройство мышления, лобно-височную деменцию (FTD), лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, связанную с хромосомой 17, лобно-височную долевую дегенерацию, болезнь Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, синдром Гийена-Барре, болезнь Халлервордена-Шпатца, гемолитико-уремический синдром, наследственный ангионевротический отек, гипофосфатаз, синдром идиопатической пневмонии, заболевания иммунного комплекса, миозит тела включения, инфекционное заболевание (например, заболевание, вызываемое бактериальными (например, *Neisseria meningitidis* или *Streptococcus*), вирусными (например, вирусом иммунодефицита человека (HIV)) или другими инфекционными агентами), воспалительное заболевание, ишемическое/реперфузионное повреждение, умеренное когнитивное нарушение, иммунотромбоцитопеническую пурпуру (ITP), дефицит кофактора молибдена (MoCD) типа А, мембранопролиферативный гломерулонефрит (MPGN) типа I, мембранопролиферативный гломерулонефрит (MPGN) типа II (болезнь плотных отложений), мембранозный нефрит, мультиинфарктную деменцию, волчанку (например, системную красную волчанку (SLE)), гломерулонефрит, болезнь Кавасаки, мультифокальную двигательную нейропатию, рассеянный склероз, множественную системную атрофию, тяжелую миастению, инфаркт миокарда, миотоническую дистрофию, оптический нейромиелит, болезнь Ниманна-Пика типа С, негуаманское заболевание двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, болезнь Паркинсона, болезнь Паркинсона с деменцией, пароксизмальную ночную гемоглобинурию, пузырчатку обыкновенную, болезнь Пика, постэнцефалитический паркинсонизм, полимиозит, прионную белковую церебральную амилоидную ангиопатию, прогрессирующий подкорковый глиоз, прогрессирующий надъядерный паралич, псориаз, сепсис, Шига-токсин *E coli* (STEC)-HuS, спинальную мышечную атрофию, инсульт, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменцию с преобладанием нейрофибриллярных клубков, отторжение трансплантата, васкулит (например, ANCA-ассоциированный васкулит), гранулематоз Вегенера, серповидно-клеточную анемию, криоглобулинемию, смешанную

криоглобулинемию, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, смешанную криоглобулинемию II типа, смешанную криоглобулинемию III типа, нефрит, медикаментозную тромбоцитопению, волчаночный нефрит, буллезный пемфигоид, приобретенный буллезный эпидермолиз, замедленную гемолитическую реакцию при переливании крови, синдром гипоклементарного крапивничного васкулита, псевдофакическую буллезную кератопатию и рефрактерность к переливанию тромбоцитов.

Болезнь Альцгеймера и некоторые формы лобно-височной деменции (болезнь Пика, спорадическая лобно-височная деменция, лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанная с хромосомой 17) представляют собой наиболее распространенные формы таутопатии. В соответствии с этим настоящее изобретение относится к любому способу, описанному выше, в котором таутопатия представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Пика, спорадическую лобно-височную деменцию и лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, связанную с хромосомой 17. Другие таутопатии включают (но не ограничиваясь только ими) прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кортикобазальную дегенерацию (CBD) и подострый склерозирующий панэнцефалит.

Нейродегенеративная таутопатия включает болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз/комплекс паркинсонизм-деменция, аргирофильную зернистость, амилоидную ангиопатию британского типа, церебральную амилоидную ангиопатию, кортикобазальную дегенерацию, болезнь Крейтцфельдта-Якоба, боксерское слабоумие, диффузные нейрофибриллярные клубки с кальцификацией, синдром Дауна, лобно-височную деменцию, лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, связанным с хромосомой 17, лобно-височную долевую дегенерацию, болезнь Герстманна-Штраусслера-Шейнкера, болезнь Халлевордена-Шпатца, миозит тела включения, множественную системную атрофию, миотоническую дистрофию, болезнь Ниманна-Пика типа С, негуаманское заболевание двигательных нейронов с нейрофибриллярными клубками, болезнь Пика, постэнцефалитический паркинсонизм, прионную белковую церебральную амилоидную ангиопатию, прогрессирующий подкорковый глиоз, прогрессирующий надъядерный паралич, подострый склерозирующий панэнцефалит, деменцию с преобладанием

нейрофибриллярных клубков, мультиинфарктную деменцию, ишемический инсульт, хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ), черепно-мозговую травму (ТБИ) и инсульт.

5 В настоящем описании предложены также способы лечения синуклеинопатии, например, болезни Паркинсона (PD); деменции с тельцами Леви (DLB); множественной системной атрофии (MSA) и т.д. Например, PD с деменцией (PDD) можно лечить с помощью способа, представленного в настоящем описании.

10 В некоторых вариантах осуществления изобретения опосредуемое комплементом заболевание или нарушение представляет собой болезнь Альцгеймера. В некоторых вариантах осуществления изобретения опосредуемое комплементом заболевание или нарушение представляет собой болезнь Паркинсона. В некоторых вариантах осуществления изобретения опосредуемое комплементом заболевание или нарушение представляет собой отторжение
15 трансплантата. В некоторых вариантах осуществления изобретения опосредуемое комплементом заболевание или нарушение представляет собой отторжение трансплантата.

20 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против C1s, представленное в настоящем описании, предупреждает или задерживает начало проявления по меньшей мере одного симптома опосредуемого комплементом заболевания или нарушения у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против C1s, представленное в настоящем описании, снижает или элиминирует по меньшей мере один симптом опосредуемого комплементом заболевания или нарушения у индивидуума.
25 Примеры симптомов включают (но не ограничиваясь только ими) симптомы, связанные с аутоиммунным заболеванием, раком, гематологическим заболеванием, инфекционным заболеванием, воспалительным заболеванием, ишемически-реперфузным повреждением, нейродегенеративным заболеванием, нейродегенеративным нарушением, почечным заболеванием, отторжением
30 трансплантата, глазным заболеванием, сосудистым заболеванием или васкулитным нарушением. Симптом может представлять собой неврологический симптомом, например, нарушение когнитивных функций, ухудшение памяти, потерю двигательной функции и т.д. Симптом может быть связан также с

активностью белка C1s в клетке, ткани или жидкости индивидуума. Симптом может быть связан также с уровнем активации комплемента в клетке, ткани или жидкости индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение индивидууму антитела против C1s, представленного в настоящем описании, модулирует активацию комплемента в клетке, ткани или жидкости индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение индивидууму антитела против C1s, представленного в настоящем описании, ингибирует активацию комплемента в клетке, ткани или жидкости индивидуума. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против C1s, представленное в настоящем описании, при его введении в одной или нескольких дозах в виде монотерапии или комбинированной терапии индивидууму, который имеет опосредуемое комплементом заболевание или нарушение, ингибирует активацию комплемента у индивидуума по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90% или более чем на 90%, по сравнению с активацией комплемента у индивидуума до обработки антителом против C1s.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против C1s, представленное в настоящем описании, снижает отложение C3 на эритроцитах; например, в некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против C1s, представленное в настоящем описании, снижает отложение C3b, iC3b и т.д. на RBC. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против C1s, представленное в настоящем описании, ингибирует опосредуемый комплементом лизис эритроцитов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против C1s, представленное в настоящем описании, снижает отложение C3 на тромбоцитах; например, в некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против C1s, представленное в настоящем описании, снижает отложение C3b, iC3b и т.д. на тромбоцитах.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение индивидууму антитела против C1s, представленного в настоящем описании, приводит к результату, выбранному из группы, которая состоит из: (а) снижения активации комплемента; (б) улучшения когнитивной функции; (в) уменьшения потери нейронов; (г) снижения уровней фосфо-Тау в нейронах; (д) снижения активации глиальных клеток; (е) снижения инфильтрации лимфоцитов; (ж) снижения инфильтрации макрофагов; (з) снижения отложения антител, (и) уменьшения потери глиальных клеток; (к) уменьшения потери олигодендроцитов; (л) снижения инфильтрации дендритных клеток; (м) снижения инфильтрации нейтрофилов; (н) снижения лизиса эритроцитов; (о) снижения фагоцитоза эритроцитов; (п) снижения фагоцитоза тромбоцитов; (р) снижения лизиса тромбоцитов; (с) улучшения выживаемости трансплантата; (т) снижения опосредуемого макрофагами фагоцитоза; (у) улучшения зрения; (ф) улучшения управления двигательной активностью; (х) улучшения в отношении образования тромбов; (ц) улучшения свертываемости крови; (ч) улучшения почечной функции; (ш) снижения опосредуемой антителом активации комплемента; (щ) снижения опосредуемого аутоантителом активации комплемента; (э) улучшения анемии; (аа) снижения демиелинизации; (аб) снижения эозинофилии; (ав) снижения отложения C3 на эритроцитах (например, снижения отложения C3b, iC3b и т.д. на RBC); и (аг) снижения отложения C3 на тромбоцитах (например, снижения отложения C3b, iC3b и т.д. на тромбоцитах); и (ад) снижения выработки анафилатоксинового токсина; (ае) снижения образования волдырей, опосредуемого аутоантителом; (аж) уменьшения зуда, вызываемого аутоантителом; (аз) снижения эритемы, вызываемой аутоантителом; (аи) снижения опосредуемой аутоантителом эрозии кожи; (ак) уменьшения разрушения эритроцитов, связанного с реакциями на трансфузию; (ал) снижения лизиса эритроцитов, связанного с аллоантителами; (ам) снижения гемолиза, связанного с реакциями на трансфузию; (ан) снижения опосредуемого аллоантителом лизиса тромбоцитов; (ао) снижения лизиса тромбоцитов, связанного с реакциями на трансфузию; (ап) снижения активации тучных клеток; (ар) снижения высвобождения гистамина тучными клетками; (ас) снижения проницаемости сосудов; (ат) уменьшения отека; (ау) снижения отложения комплемента на эндотелии трансплантата; (аф) снижения выработки

анафилатоксина в эндотелии трансплантата; (ах) уменьшения расстояния между дермо-эпидермальным соединением; (ац) снижения выработки анафилатоксина в дермо-эпидермальном соединении; (ач) снижения опосредуемого аллоантителом активации комплемента в эндотелии трансплантата; (аш) снижения

5 опосредуемой антителом потери нервно-мышечного соединения; (ащ) снижения активации комплемента в нервно-мышечном соединении; (аз) снижения выработки анафилатоксина в нервно-мышечном соединении; (ба) снижения отложения комплемента в нервно-мышечном соединении; (бб) уменьшения паралича; (бв) уменьшения онемения; (бг) повышения контроля над мочевым

10 пузырем; (бд) повышения контроля над кишечником; (бе) снижения смертности, связанной с аутоантителами; и (бж) снижения заболеваемости, связанной с аутоантителами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против C1s, представленное в настоящем описании, при его введении в одной или

15 нескольких дозах в виде монотерапии или комбинированной терапии индивидууму, который имеет опосредуемое комплементом заболевание или нарушение, обеспечивает снижение по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 30%, по

20 меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90% или более чем на 90% одного или нескольких из следующих показателей: (а) активация комплемента; (б) снижение когнитивной функции; (в) потеря нейронов; (г)

25 уровни фосфо-Тау в нейронах; (д) активация глиальных клеток; (е) инфильтрация лимфоцитов; (ж) инфильтрация макрофагов; (з) отложение антитела, (и) потеря глиальных клеток; (к) потеря олигодендроцитов; (л) инфильтрация дендритных клеток; (м) инфильтрация нейтрофилов; (н) лизис эритроцитов; (о) фагоцитоз эритроцитов; (п) фагоцитоз тромбоцитов; (р) лизис

30 тромбоцитов; (с) отторжение трансплантата; (т) опосредуемый макрофагами фагоцитоз; (у) потеря зрения; (ф) опосредуемая антителом активация комплемента; (х) опосредуемая аутоантителом активация комплемента; (ц)

демиелинизация; (ч) эозинофилия; по сравнению с уровнем показателя или его степенью у индивидуума до лечения антителом против C1s.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против C1s, представленное в настоящем описании, при его введении в одной или
5 нескольких дозах в виде монотерапии или комбинированной терапии индивидууму, который имеет опосредуемое комплементом заболевание или нарушение, обеспечивает улучшение по меньшей мере примерно на 10%, по
10 меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по
15 меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90% или более чем на 90% одного или нескольких из следующих показателей: а) когнитивная
20 функция; б) выживаемость трансплантата; в) зрение; г) управление двигательной активностью; д) образование тромбов; е) свертываемость крови; ж) почечная
25 функция; и з) гематокрит (количество эритроцитов), по сравнению с уровнем показателя или его степенью у индивидуума до лечения антителом против C1s.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение индивидууму антитела против C1s, представленного в настоящем описании, снижает
20 активацию комплемента у индивидуума. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против C1s, представленное в настоящем описании, при его введении в одной или нескольких дозах в виде монотерапии
25 или комбинированной терапии индивидууму, который имеет опосредуемое комплементом заболевание или нарушение, снижает активацию комплемента у индивидуума по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на
30 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по
35 меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90% или более чем на 90% по сравнению с активацией комплемента у индивидуума до лечения антителом против C1s.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение индивидууму антитела против C1s, представленного в настоящем описании, улучшает

когнитивную функцию у индивидуума. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против C1s, представленное в настоящем описании, при его введении в одной или нескольких дозах в виде монотерапии или комбинированной терапии индивидууму, который имеет опосредуемое

5 комплементом заболевание или нарушение, улучшает когнитивную функцию у индивидуума по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по

10 меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90% или более чем на 90% по сравнению с когнитивной функцией у индивидуума до лечения антителом против C1s.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение индивидууму антитела против C1s, представленного в настоящем описании уменьшает

15 скорость снижения когнитивной функции у индивидуума. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против C1s, представленное в настоящем описании, при его введении в одной или нескольких дозах в виде монотерапии или комбинированной терапии индивидууму, который имеет опосредуемое комплементом заболевание или

20 нарушение, уменьшает скорость снижения когнитивной функции у индивидуума по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по

25 меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90% или более чем на 90% по сравнению со скоростью снижения когнитивной функции у индивидуума до лечения антителом против C1s.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение индивидууму антитела против C1s, представленного в настоящем описании уменьшает потерю

30 нейронов у индивидуума. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против C1s, представленное в настоящем описании, при его введении в одной или нескольких дозах в виде монотерапии или

комбинированной терапии индивидууму, который имеет опосредуемое
комплементом заболевание или нарушение, уменьшает потерю нейронов у
индивидуума по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на
15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по
5 меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по
меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по
меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по
меньшей мере примерно на 90% или более чем на 90% по сравнению с потерей
нейронов у индивидуума до лечения антителом против C1s.

10 В некоторых вариантах осуществления изобретения введение индивидууму
антитела против C1s, представленного в настоящем описании снижает уровни
фосфо-Тauf у индивидуума. Например, в некоторых вариантах осуществления
изобретения антитело против C1s, представленное в настоящем описании, при
его введении в одной или нескольких дозах в виде монотерапии или
15 комбинированной терапии индивидууму, который имеет опосредуемое
комплементом заболевание или нарушение, снижает уровни фосфо-Тauf у
индивидуума по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на
15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по
меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по
20 меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по
меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по
меньшей мере примерно на 90% или более чем на 90% по сравнению с уровнями
фосфо-Тauf у индивидуума до лечения антителом против C1s.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение индивидууму
25 антитела против C1s, представленного в настоящем описании снижает
активацию глиальных клеток у индивидуума. Например, в некоторых вариантах
осуществления изобретения антитело против C1s, представленное в настоящем
описании, при его введении в одной или нескольких дозах в виде монотерапии
или комбинированной терапии индивидууму, который имеет опосредуемое
30 комплементом заболевание или нарушение, снижает активацию глиальных
клеток у индивидуума по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере
примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере
примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере

примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90% или более чем на 90% по сравнению с активацией глиальных клеток у индивидуума до лечения антителом против C1s. В некоторых вариантах осуществления изобретения глиальные клетки представляют собой астроциты или микроглию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение индивидууму антитела против C1s, представленного в настоящем описании, снижает инфильтрацию лимфоцитов у индивидуума. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против C1s, представленное в настоящем описании, при его введении в одной или нескольких дозах в виде монотерапии или комбинированной терапии индивидууму, который имеет опосредуемое компонентом заболевание или нарушение, снижает инфильтрацию лимфоцитов у индивидуума по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90% или более чем на 90% по сравнению с инфильтрацией лимфоцитов у индивидуума до лечения антителом против C1s.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение индивидууму антитела против C1s, представленного в настоящем описании, снижает инфильтрацию макрофагов у индивидуума. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против C1s, представленное в настоящем описании, при его введении в одной или нескольких дозах в виде монотерапии или комбинированной терапии индивидууму, который имеет опосредуемое компонентом заболевание или нарушение, снижает инфильтрацию макрофагов у индивидуума по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по

меньшей мере примерно на 90% или более чем на 90% по сравнению с инфильтрацией макрофагов у индивидуума до лечения антителом против C1s.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение индивидууму антитела против C1s, представленного в настоящем описании, снижает отложение антитела у индивидуума. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против C1s, представленное в настоящем описании, при его введении в одной или нескольких дозах в виде монотерапии или комбинированной терапии индивидууму, который имеет опосредуемое комплементом заболевание или нарушение, снижает отложение антитела у индивидуума по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90% или более чем на 90% по сравнению с отложением антитела у индивидуума до лечения антителом против C1s.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение индивидууму антитела против C1s, представленного в настоящем описании, снижает выработку анафилатоксина (например, C3a, C4a, C5a) у индивидуума. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против C1s, представленное в настоящем описании, при его введении в одной или нескольких дозах в виде монотерапии или комбинированной терапии индивидууму, который имеет опосредуемое комплементом заболевание или нарушение, снижает выработку анафилатоксина у индивидуума по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90% или более чем на 90% по сравнению с уровнем выработки анафилатоксина у индивидуума до лечения антителом против C1s.

В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем описании предложено применение антитела против C1s, представленного в настоящем

описании, или фармацевтической композиции, содержащей антитело против C1s, представленное в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый эксципиент, для лечения индивидуума, который имеет опосредуемое комплементом заболевание или нарушение. В некоторых вариантах

5 осуществления изобретения в настоящем описании предложено применение антитела против C1s, представленного в настоящем описании, для лечения индивидуума, который имеет опосредуемое комплементом заболевание или нарушение. В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем

10 описании предложено применение фармацевтической композиции, содержащей антитело против C1s, представленное в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый эксципиент, для лечения индивидуума, который имеет опосредуемое комплементом заболевание или нарушение.

В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем описании предложено применение антитела против C1s, представленного в настоящем

15 описании, для приготовления лекарственного средства для профилактики или лечения индивидуума, который имеет опосредуемое комплементом заболевание или нарушение.

В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем описании предложено применение антитела против C1s, представленного в настоящем

20 описании, или фармацевтической композиции, содержащей антитело против C1s, представленное в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый эксципиент, для ингибирования активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем описании предложено применение

25 антитела против C1s, представленного в настоящем описании, или фармацевтической композиции, содержащей антитело против C1s, представленное в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый эксципиент, для ингибирования активации комплемента у индивидуума, который имеет опосредуемое комплементом заболевание или нарушение. В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем описании

30 предложено применение антитела против C1s, представленного в настоящем описании, для ингибирования активации комплемента у индивидуума, который имеет опосредуемое комплементом заболевание или нарушение. В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем описании предложено

применение фармацевтической композиции, содержащей антитело против C1s, представленное в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый эксципиент, для ингибирования активации комплемента у индивидуума, который имеет опосредуемое комплементом заболевание или нарушение.

5 В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем описании предложено применение антитела против C1s, представленного в настоящем описании, для приготовления лекарственного средства для модуляции активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления изобретения лекарственное средство ингибирует активацию комплемента. В некоторых вариантах
10 осуществления изобретения лекарственное средство ингибирует активацию комплемента у индивидуума, имеющего опосредуемое комплементом заболевание или нарушение.

 В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем описании предложено антитело против C1s, представленное в настоящем описании, или
15 фармацевтическая композиция, содержащая антитело против C1s, представленное в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый эксципиент, для применения в медикаментозной терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем описании предложено антитело против C1s, представленное в настоящем описании, для применения в
20 медикаментозной терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против C1s, представленное в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый эксципиент, для применения в медикаментозной терапии.

 В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем описании
25 предложено антитело против C1s, представленное в настоящем описании, или фармацевтическая композиция, содержащая антитело против C1s, представленное в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый эксципиент, для лечения индивидуума, имеющего опосредуемое комплементом заболевание или нарушение. В некоторых вариантах осуществления изобретения
30 в настоящем описании предложено антитело против C1s, представленное в настоящем описании, для лечения индивидуума, имеющего опосредуемое комплементом заболевание или нарушение. В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем описании предложена

фармацевтическая композиция, содержащая антитело против C1s, представленное в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый эксципиент, для лечения индивидуума, имеющего опосредуемое комплементом заболевание или нарушение.

5 В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем описании предложено антитело против C1s, представленное в настоящем описании, или фармацевтическая композиция, содержащая антитело против C1s, представленное в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый эксципиент, для модуляции активации комплемента. В некоторых вариантах
10 осуществления изобретения в настоящем описании предложено антитело против C1s, представленное в настоящем описании, для модуляции активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем описании предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против C1s, представленное в настоящем описании, и фармацевтически
15 приемлемый эксципиент, для модуляции активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против C1s ингибирует активацию комплемента.

В следующем объекте изобретения предложено применения антитела против C1s для производства или получения лекарственного средства. В одном
20 из вариантов осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для лечения опосредуемого комплементом заболевания или нарушения. В следующем варианте осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения опосредуемого комплементом заболевания или нарушения, включающем введение индивидууму, который
25 имеет опосредуемое комплементом заболевание или нарушение, лекарственного средства в эффективном количестве. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения способ включает дополнительно введение индивидууму в эффективном количестве по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, например, указанного ниже. В
30 следующем варианте осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для применения для усиления клиренса (или удаления) C1s из плазмы. В другом варианте осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для применения для усиления клиренса (или удаления) C1r2s2 из

плазмы. В другом варианте осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для применения для усиления клиренса (или удаления) C1r2s2 из плазмы, но не C1q из плазмы. В другом варианте осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для применения для ингибирования компонента классического пути комплемента; в некоторых случаях компонент классического пути комплемента представляет собой C1s.

В следующем варианте осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения индивидуума, имеющего опосредуемое комплементом заболевание или нарушение, включающем введение индивидууму лекарственного средства в эффективном количестве. «Индивидуум» в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения может представлять собой человека.

В следующем объекте изобретения предложен способ лечения опосредуемого комплементом заболевания или нарушения. В одном из вариантов осуществления изобретения способ включает введение индивидууму, который имеет указанное опосредуемое комплементом заболевание или нарушение, антитела против C1s в эффективном количестве. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения способ включает дополнительно введение индивидууму в эффективном количестве по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, например, указанного ниже. «Индивидуум» в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения может представлять собой человека.

В следующем объекте изобретения предложен способ усиления клиренса (или удаления) C1s из плазмы у индивидуума. В следующем объекте изобретения предложен способ усиления клиренса (или удаления) C1r2s2 из плазмы у индивидуума. В следующем объекте изобретения предложен способ усиления клиренса (или удаления) C1r2s2 из плазмы, но не C1q из плазмы у индивидуума. В некоторых случаях в изобретении предложен способ ингибирования компонента классического пути комплемента у индивидуума; в некоторых случаях компонент классического пути комплемента представляет собой C1s. В одном из вариантов осуществления изобретения "индивидуум" представляет собой человека.

Следующим объектом изобретения являются фармацевтические композиции, содержащие любое из антител против C1s, представленных в настоящем описании, например, предназначенные для применения в любом из вышеуказанных терапевтических способов. В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит любое из антител против C1s, представленных в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит любое из антител против C1s, представленных в настоящем описании, и по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент, например, указанный ниже.

Антитела, предлагаемые в изобретении, можно применять в терапии либо индивидуально, либо в сочетании с другими агентами. Например, антитело, предлагаемое в изобретении, можно вводить совместно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом.

Такие комбинированные терапии, указанные выше, предусматривают совместное введение (когда два или большее количество терапевтических агентов включены в одну и ту же или различные композиции) и отдельное введение, в этом случае введение антитела, предлагаемого в изобретении, можно осуществлять до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента или агентов. В одном из вариантов осуществления изобретения введение антитела против C1s и введение дополнительного терапевтического агента можно осуществлять в пределах примерно месяца или в пределах примерно 1, 2 или 3 недель, или в пределах примерно 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней друг относительно друга. Антитела, предлагаемые в изобретении, можно применять также в комбинации с лучевой терапией.

Антитело, предлагаемое в изобретении (и необязательно любой дополнительный терапевтический агент), можно вводить любыми приемлемыми путями, включая парентеральный, внутрилегочный и интраназальный путь и при необходимости применять для местной обработки, введения в повреждение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Дозирование можно осуществлять любым приемлемым путем, например, путем инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, в зависимости, в том числе,

от того, является ли лечение кратковременным или хроническим. Можно применять различные схемы дозирования, включая (но не ограничиваясь только ими) однократное введение или несколько введений в различные моменты времени, болюсное введение и пульсирующую инфузию.

5 Антитела, предлагаемые в изобретении, можно включать в состав композиций, дозировать и вводить в соответствии с надлежащей клинической практикой. Рассматриваемые в этом контексте факторы включают конкретное нарушение, подлежащее лечению, конкретное молокопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние индивидуального пациента, причину
10 нарушения, область введения агента, метод введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим медикам. Антитело можно, но это не является обязательным, включать в композицию в сочетании с одним или несколькими другими агентами, которые в настоящее время применяют для профилактики и лечения рассматриваемого нарушения. Эффективное количество
15 указанных других агентов зависит от количества антитела, присутствующего в композиции, типа нарушения или лечения и других указанных выше факторов. Их, как правило, применяют в таких же дозах и с использованием таких же путей введения, которые указаны в настоящем описании, или в количестве, составляющем от 1 до 99% от дозы, указанной в настоящем описании, или в
20 любой дозе и с помощью любого пути, которые по данным эмпирической/клинической оценки являются пригодными.

 Для предупреждения или лечения заболевания приемлемая доза антитела, предлагаемого в изобретении (при его применении индивидуально или в сочетании с одним или несколькими другими дополнительными
25 терапевтическими агентами), должна зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа антитела, серьезности и течения болезни, применяют ли антитело для превентивных или терапевтических целей, предшествующей терапии, истории болезни пациента и ответа на антитело, а также предписания лечащего врача. Антитело можно вводить пациенту
30 однократно или в виде серий обработок. В зависимости от типа и серьезности заболевания примерно от 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1-10 мг/кг) антитела может представлять собой начальную возможную дозу для введения пациенту, например, с помощью одной или нескольких отдельных обработок или с

помощью непрерывной инфузии. Одним из примеров типичных суточных доз может являться доза, составляющая от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более в зависимости от указанных выше факторов. При использовании повторных введений в течение нескольких дней или более длительного периода времени, в зависимости от состояния, лечение, как правило, следует продолжать до достижения требуемого подавления симптомов заболевания. Одним из примеров доз антитела является доза, составляющая от примерно 0,05 до примерно 10 мг/кг. Так, пациенту можно вводить одну или несколько следующих доз: примерно 0,5, 2,0, 4,0 или 10 мг/кг (или любую их комбинацию). Указанные дозы можно вводить дробно, например, каждую неделю или каждые три недели (например, так, чтобы пациент получал от примерно двух до примерно двадцати, например, примерно шесть доз антитела). Можно применять начальную повышенную ударную дозу с последующим введением одной или нескольких более низких доз. Однако можно применять и другие схемы введения доз. С помощью общепринятых методов и анализов можно легко осуществлять мониторинг действия указанной терапии.

Очевидно, что любые из вышеуказанных композиций или терапевтических способов можно применять с использованием иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, вместо или в дополнение к антителу против C1s.

VIII. Изделия

Другим объектом изобретения является изделие, которое содержит продукты, применяемые для лечения, предупреждения и/или диагностирования указанных выше нарушений. Изделие представляет собой контейнер и этикетку или листовку-вкладыш в упаковку, которые прилагаются к контейнеру или вложены в него. Приемлемыми контейнерами являются, например банки, пузырьки, шприцы, пакеты для внутривенного (IV) раствора и т. д. Контейнеры можно изготавливать из различных материалов, таких как стекло или пластмасса. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией является эффективной для лечения, предупреждения и/или диагностирования состояния, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или пузырек, снабженный пробкой, которую можно прокалывать с помощью иглы для подкожных инъекций). По меньшей мере одно

действующее вещество в композиции представляет собой антитело, предлагаемое в изобретении. На этикетке или листовке-вкладыше в упаковку указано, что композицию применяют для лечения выбранного состояния. Кроме того, изделие может включать (а) первый контейнер с находящейся в нем композицией, где композиция содержит антитело, предлагаемое в изобретении; и (б) второй контейнер с находящейся в нем композицией, где композиция содержит дополнительное цитотоксическое или иное терапевтическое средство. Согласно этому варианту осуществления изобретения изделие может содержать листовку-вкладыш в упаковку, которая содержит информацию о том, что композиции можно использовать для лечения конкретного состояния. В альтернативном или дополнительном варианте изделие может дополнительно включать второй (или третий) контейнер с фармацевтически приемлемым буфером, таким как бактериостатическая вода для инъекций (БСВИ), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, оно может включать другие продукты, необходимые с коммерческой точки зрения и с точки зрения потребителя, в частности, другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Как должно быть очевидно, любое из указанных выше изделий может включать иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, вместо или в дополнение к антителу против C1s.

Примеры

Ниже приведены примеры методов и композиций, предлагаемых в изобретении. Как должно быть очевидно, различные другие варианты осуществления изобретения можно применять на практике с учетом общего описания изобретения, представленного выше.

Хотя выше изобретение описано для лучшего понимания с указанием некоторых деталей с целью иллюстрации и примеров, описание и примеры не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения. Описание всей патентной и научной литературы, процитированной в настоящем описании, специально полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Пример 1

Получение рекомбинанта C1r2s2

1.1. Экспрессия и очистка человеческого тетрамера C1r2s2 (hC1r2s2)

Применяемые для экспрессии и очистки последовательности представляли собой последовательности человеческого C1s (NCBI, референс-последовательность: NP_958850.1) (SEQ ID NO: 1) и человеческого C1r (NCBI, референс-последовательность: NP_001724.3). Последовательность человеческого C1r включает мутации R463Q и S654A (SEQ ID NO: 2). Для экспрессии рекомбинантных человеческих тетрамеров C1r2s2 человеческий C1s и человеческий C1r кратковременно совместно экспрессировали, используя клеточную линию HEK293 (Expi293®) (фирма Thermo Fisher, Карлсбад, шт. Калифорния, США) или клеточную линию FreeStyle® 293-F (фирма Thermo Fisher, Карлсбад, шт. Калифорния, США). Супернатант культуры, экспрессирующей рекомбинантный человеческий C1r2s2, разводили трехкратно водой MilliQ®, добавляли CaCl₂ (фирма Wako) до достижения конечной концентрации 2мМ, значение pH доводили с помощью 1н. NaOH до pH 8, полученную смесь вносили на колонку для анионообменной хроматографии Q Сефароза HP (фирма GE healthcare), уравновешенную 50мМ Трис-HCl, 2мМ CaCl₂, pH 8,0 и элюировали в градиенте NaCl. Элюированные фракции, содержащие рекомбинантные человеческие тетрамеры C1r2s2, собирали, концентрировали и затем вносили на колонку для гель-фильтрации Superdex® 200 (фирма GE healthcare), уравновешенную буфером 1× TBS (фирма Wako), 2мМ CaCl₂. Затем фракции, содержащие рекомбинантные человеческие тетрамеры C1r2s2, объединяли, при необходимости концентрировали и хранили при -80°C.

1.2. Экспрессия и очистка тетрамера C1r2s2 обезьян циномолгус (cyC1r2s2)

Применяемые для экспрессии и очистки последовательности представляли собой последовательности C1s циномолгус (SEQ ID NO: 3) и C1r циномолгус. Последовательность C1r циномолгус включала мутации R463Q и S654A (SEQ ID NO: 4). Для экспрессии рекомбинантных тетрамеров C1r2s2 циномолгус C1s циномолгус и C1r циномолгус кратковременно совместно экспрессировали, используя клеточную линию HEK293 (Expi293®) (фирма Thermo Fisher, Карлсбад, шт. Калифорния, США). Супернатант культуры, экспрессирующей

рекомбинантный C1r2s2 циномогус, разводили трехкратно водой MilliQ®, добавляли CaCl₂ (фирма Wako) до достижения конечной концентрации 2мМ, значение рН доводили с помощью 1н. NaOH до рН 8, полученную смесь вносили на колонку для анионообменной хроматографии Q Сефароза HP (фирма GE healthcare), уравновешенную 50мМ Трис-HCl, 2мМ CaCl₂, рН 8,0 и элюировали в градиенте NaCl. Элюированные фракции, содержащие рекомбинантные тетрамеры C1r2s2 циномогус, собирали, концентрировали и затем вносили на колонку для гель-фильтрации Superdex® 200 (фирма GE healthcare), уравновешенную буфером 1× TBS (фирма Wako), 2мМ CaCl₂. Затем фракции, содержащие рекомбинантные тетрамеры C1r2s2 циномогус, объединяли и хранили при -80°C.

Пример 2

Получение рекомбинантных Fc-гамма-рецепторов

2.1. Получение Fc-гамма-рецепторов циномогус (cyFcγR)

Гены внеклеточного домена Fc-гамма-рецептора циномогус конструировали, используя методы, известные специалистам в данной области, и клонировали кДНК каждого Fc-гамма-рецептора обезьян циномогус. В разделе "Перечень последовательностей" представлены следующие аминокислотные последовательности внеклеточного домена Fc-гамма-рецепторов: (Fc-гамма-рецептор Ia циномогус [cyFcγRIa] представлен в SEQ ID NO: 5, Fc-гамма-рецептор IIa1 циномогус [cyFcγRIIa1] представлен в SEQ ID NO: 6, Fc-гамма-рецептор IIa2 циномогус [cyFcγRIIa2] представлен в SEQ ID NO: 7, Fc-гамма-рецептор IIa3 циномогус [cyFcγRIIa3] представлен в SEQ ID NO: 8, Fc-гамма-рецептор IIb циномогус [cyFcγRIIb] представлен в SEQ ID NO: 9, Fc-гамма-рецептор IIIa (R) циномогус [cyFcγRIIIa(R)] представлен в SEQ ID NO: 10, Fc-гамма-рецептор IIIa (S) циномогус [cyFcγRIIIa(S)] представлен в SEQ ID NO: 11). Далее генетическую последовательность, кодирующую His-метку, присоединяли к 3'-концу каждого гена. Каждый из полученных генов встраивали в экспрессионный вектор, предназначенный для экспрессии в клетках млекопитающих, с помощью методов, известных специалистам в данной области. Экспрессионный вектор интродуцировали в клетки, полученные из почки человеческого эмбриона FreeStyle293 (фирма Invitrogen), для экспрессии белков-мишеней. После культивирования полученный супернатант культуры,

как правило, фильтровали и очищали с использованием 4 следующих стадий. На первой стадии осуществляли катионообменную хроматографию с использованием SP Сефарозы FF. На второй стадии осуществляли аффинную хроматографию против His-метки (HisTrap HP). На третьей стадии осуществляли 5 гель-фильтрацию на колонках (Супердекс200). На четвертой стадии осуществляли стерилизацию фильтрацией. Абсорбцию очищенного белка при 280 нм измеряли с помощью спектрофотометра, а концентрацию очищенного белка определяли, используя коэффициент абсорбции, рассчитанный с помощью метода PACE (Protein Science 4, 1995, сс. 2411-2423).

10 2.2. Получение человеческих Fc-гамма-рецепторов (hFcγR)

Генетические последовательности внеклеточного домена человеческих Fc-гамма-рецепторов получали из человеческого Fc-гамма-рецептора Ia (NCBI, референс-последовательность: NM_000566.3), человеческого Fc-гамма-рецептора IIa (NCBI, референс-последовательность: NM_001136219.1), 15 человеческого Fc-гамма-рецептора IIb (NCBI, референс-последовательность: NM_004001.3), человеческого Fc-гамма-рецептора IIIa (NCBI, референс-последовательность: NM_001127593.1) и человеческого Fc-гамма-рецептора IIIb (NCBI, референс-последовательность: NM_000570.3). Полиморфные сайты создавали в соответствии со следующими документами (касательно 20 человеческого Fc-гамма-рецептора IIa: Warmerdam P. A. M. и др., J. Exp. Med. 172, 1990, сс. 19-25; касательно человеческого Fc-гамма-рецептора IIIa: Wu J. и др., J. Clin. Invest. 100(5), 1997, сс. 1059-1070; касательно человеческого Fc-гамма-рецептора IIIb: Ory P. A. и др., J. Clin. Invest. 84, 1989, сс. 1688-1691).

В разделе "Перечень последовательностей" представлены применяемые для 25 экспрессии и очистки следующие аминокислотные последовательности внеклеточного домена Fc-гамма-рецепторов: (человеческий Fc-гамма рецептор Ia [hFcγRIa] представлен в SEQ ID NO: 12, человеческий Fc-гамма-рецептор IIa_167R [hFcγRIIa_167R] представлен в SEQ ID NO: 13, человеческий Fc-гамма-рецептор IIa_167H [hFcγIIa_167H] представлен в SEQ ID NO: 14, человеческий 30 Fc-гамма-рецептор IIb [hFcγRIIb] представлен в SEQ ID NO: 15, человеческий Fc гамма-рецептор IIIa_176F [hFcγRIIIa_176F] представлен в SEQ ID NO: 16, человеческий Fc-гамма-рецептор IIIa_176V [hFcγRIIIa_176V] представлен в SEQ ID NO: 17, человеческий Fc-гамма-рецептор IIIb_NA1 [hFcγRIIb_NA1]

представлен в SEQ ID NO: 18, человеческий Fc-гамма-рецептор IIIb_NA2 [hFcγRIIIb_NA2] представлен в SEQ ID NO: 19). Далее His-метку, присоединяли к 3'-концу и каждый из полученных генов встраивали в экспрессионный вектор, предназначенный для экспрессии в клетках млекопитающих, с помощью методов, известных специалистам в данной области. Экспрессионный вектор интродуцировали в клетки, полученные из почки человеческого эмбриона FreeStyle293 (фирма Invitrogen), для экспрессии белков-мишеней. После культивирования полученный супернатант культуры, как правило, фильтровали и очищали с использованием 4 следующих стадий или 3 стадий, исключая стадию анионообменной хроматографии. На первой стадии осуществляли анионообменную хроматографию с использованием Q Сефарозы Fast Flow (фирма GE Healthcare). На второй стадии осуществляли аффинную хроматографию против His-метки (HisTrap HP). На третьей стадии осуществляли гель-фильтрацию на колонках, используя HiLoad 26/600 Супердекс 200 пг (фирма GE Healthcare). На четвертой стадии осуществляли стерилизацию фильтрацией. Абсорбцию очищенного белка при 280 нм измеряли с помощью спектрофотометра, а концентрацию очищенного белка определяли, используя коэффициент абсорбции, рассчитанный с помощью метода PACE (Protein Science 4, 1995, сс. 2411-2423).

20 Пример 3

Получение антител против C1s

3.1. Получение IPN009VH2VK3-SG1148

Синтезировали полинуклеотиды переменных областей тяжелых и легких цепей антител против C1s IPN009VH2 (SEQ ID NO: 20) и IPN009VK3 (SEQ ID NO: 21) (согласно методу, описанному в WO 2019/098212). Указанные переменные области тяжелых и легких цепей клонировали в экспрессионных векторах, содержащих константную область тяжелой цепи SG1148 (SEQ ID NO: 22) и константную область легкой цепи SK1 (SEQ ID NO: 23) соответственно.

Антитело против C1s IPN009VH2VK3-SG1148 одновременно экспрессировали, используя клетки Expi293® F (фирма Life technologies), согласно инструкциям производителя. Рекомбинантные антитела очищали с использованием белка А (фирма GE Healthcare) и элюировали с помощью D-3ФР, забуференного Трис физиологического раствора (TBS) или His-буфера

(20мМ гистидин, 150мМ NaCl, pH 6,0). Далее при необходимости осуществляли молекулярно-ситовую хроматографию для удаления высокомолекулярных и/или низкомолекулярных компонентов.

5 3.2. Создание антител против C1s с оптимизированными pH-зависимостью, изоэлектрической точкой и способностью связываться с Fc-гамма-рецепторами, и получение различных антител против C1s

Для создания антител-"мусорщиков" против C1s, которые усиливают клиренс C1s из плазмы, и для достижения длительной нейтрализации C1s в крови, получали 3 антитела, в которых константную область тяжелой цепи SG1077R с усиленной способностью связываться с Fc γ R (аналог Fc циномоглугс, соответствующий человеческому TT91R) соединяли с каждым из трех 3 Fab (COS0637pHv2, COS0637pHv3 и COS0637pHv8 (заявка на японский патент № 2019-189148)) (см. последовательности в таблице 1). Указанные антитела применяли для осуществления фармакокинетических (ФК) тестов у обезьян; однако ФК-профили всех антител оказались ниже, чем у обычных терапевтических антител, и они не могли подавлять активность комплемента в течение длительного периода (примеры 4 и 10). Сравнивали COS0637pHv2-SG1077R с наиболее низкими показателями ФК и COS0637pHv3-SG1077R и COS0637pHv8-SG1077R с несколько более высокими показателями ФК. COS0637pHv3-SG1077R и COS0637pHv8-SG1077R имели более низкие теоретические изоэлектрические точки (pI) по сравнению с COS0637pHv2-SG1077R (8,76 (COS0637pHv3-SG1077R), 8,76 (COS0637pHv8-SG1077R) и 9,27 (COS0637pHv2-SG1077R) соответственно). Кроме того, осуществляли сравнение связывающей способности Fab. По сравнению с COS0637pHv2 оба антитела COS0637pHv3 и COS0637pHv8 обладали более сильной pH-зависимостью (заявка на японский патент № 2019-189148: KD(pH5,8)/KD(pH7,4) = 44(COS0637pHv2), 278(COS0637pHv3), 117(COS0637pHv8)). Таким образом, при создании изобретения выдвинута гипотеза о том, что ФК антитела против C1s можно дополнительно улучшать путем дополнительного усиления pH-зависимости и снижения pI, и были осуществлены тесты для подтверждения указанной гипотезы. Кроме того, для оценки влияния на ФК способности связываться с Fc γ R, осуществляли исследования ФК на обезьянах (пример 4) COS0637pHv2-SG1077R и COS0637pHv2-FcgSil (таблицы 9 и 10), которые

получали путем подавления всего связывания с FcγR циномоглус у COS0637pHv2-SG1077R. В результате установлено, что ФК антитела против C1s COS0637pHv2-SG1077R удалось улучшать путем подавления связывания с FcγR. Основываясь на вышеуказанных результатах, была предпринята попытка улучшить фармакокинетику путем оптимизации как Fab, так и Fc. Список антител и ID-номера их последовательностей, которые применяли для исследований ФК на обезьянах, представлен в таблице 1. Кроме того, в таблице 1 представлены также последовательности антител COS0637pHv8-TT91R и COS0637pHv3-TT91R, которые применяли в качестве контролей в анализах связывания.

Таблица 1. Обозначения антител, применяемых для исследования ФК на обезьянах, и антител, применяемых в качестве контролей в анализах связывания, и соответствующие SEQ ID NO:

Обозначение антитела	SEQ ID NO:			
	VH	VL	CH	CL
COS0637pHv2-SG1077R	41	46	42	23
COS0637pHv2-FcgSil	41	46	43	23
COS0637pHv3-SG1077R	40	64	42	23
COS0637pHv8-SG1077R	24	63	42	23
COS0637pHv8-TT91R	24	63	44	23
COS0637pHv3-TT91R	40	64	44	23

Для оптимизации антител с целью улучшения фармакокинетики и медицинского действия Fab COS0637pHv8-TT91R, для которого подтверждена высокая степень зависимости от pH (пример 5), применяли в качестве матрицы для поиска аминокислотных изменений в Fab, которые улучшают pH-зависимость, и для поиска аминокислотных изменений в Fc, которые снижают pH и уменьшают связывание с FcγR.

Сначала для улучшения зависимости от pH аминокислоты в COS0637pHv8 модифицировали с получением антител, представленных в таблице 2, которые имеют улучшенную зависимость от pH (данные об улучшении pH-зависимости представлены в примере 5).

Таблица 2. Обозначение антител с улучшенной рН-зависимостью и соответствующие SEQ ID NO:

Обозначение антитела	SEQ ID NO:											
	H-цепь	L-цепь	VH	VL	CH	CL	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3
COS0637pHv15-TT91R	78	79	24	59	44	23	25	26	27	60	61	62
COS0637pHv16-TT91R	80	81	36	55	44	23	37	38	39	56	57	58
COS0637pHv17-TT91R	82	83	24	55	44	23	25	26	27	56	57	58
COS0637pHv21-TT91R	84	85	24	47	44	23	25	26	27	48	49	50
COS0637pHv23-TT91R	86	87	28	51	44	23	29	30	31	52	53	54
COS0637pHv25-TT91R	88	89	32	55	44	23	33	34	35	56	57	58

5 Кроме того, у всех этих антител обнаружена наличие "функции/активности вытеснения" или "функции/активности вытеснения C1q", которая способствует высвобождению C1q из комплекса C1qgs посредством связывания с комплексом C1q и C1r2s2 (комплекс C1qgs) (пример 6).

10 Кроме того, получали константную область тяжелой цепи, рI которой снижали и способностью которой связываться с FcγR подавляли (G1A3FcγSil+LowpI) (примеры 7 и 8). Изменения G137E, H268Q, K274Q, R355Q и Q419E (во всех случаях нумерация согласно системе EU-нумерации), интродуцированные в нативную последовательность IgG1, снижали рI. Изменения L235R и G236R, интродуцированные в нативную последовательность
15 IgG1, подавляли связывание с FcγR.

Молекулы с улучшенной зависимостью от рН, пониженной рI и подавленной способностью связываться с FcγR получали путем объединения указанных последовательностей Fab и последовательностей константных областей тяжелых цепей (таблица 3). Кроме того, указанные последовательности
20 анти-C1s Fab с улучшенной зависимостью от рН, можно объединять, например, с Fc антител-"мусорщиков" с усиленной способностью связываться с FcγR, такими

как TT91R и SG1077R, для достижения более высокой "подметающей" способности и более длительной способности нейтрализовать активность комплемента по сравнению с антителами с низкой зависимостью от pH.

5 Таблица 3. Обозначение антител, полученных путем объединения Fab с улучшенной зависимостью от pH и Fc с пониженной pI и подавленным FcγR-связыванием, и соответствующие SEQ ID NO:

Обозначение антитела	SEQ ID NO:					
	H-цепь	L-цепь	VH	VL	CH	CL
COS0637pHv15-G1A3FcgSil+LowpI	66	67	24	59	45	23
COS0637pHv16-G1A3FcgSil+LowpI	68	69	36	55	45	23
COS0637pHv17-G1A3FcgSil+LowpI	70	71	24	55	45	23
COS0637pHv21-G1A3FcgSil+LowpI	72	73	24	47	45	23
COS0637pHv23-G1A3FcgSil+LowpI	74	75	28	51	45	23
COS0637pHv25-G1A3FcgSil+LowpI	76	77	32	55	45	23
COS0637pHv8-G1A3FcgSil+LowpI	-	-	24	63	45	23

10 Для получения последовательностей каждого антитела синтезировали гены, кодирующие переменную область тяжелой цепи (VH), и объединяли с модифицированной константной областью тяжелой цепи человеческого IgG1 (CH) (SG1, SEQ ID NO: 65), модифицированной CH человеческого IgG1, например, SG1077R (SEQ ID NO: 42), FcgSil (SEQ ID NO: 43), TT91R (SEQ ID NO: 44), G1A3FcgSil+LowpI (SEQ ID NO: 45) и SG1148 (SEQ ID NO: 22).
 15 Синтезировали гены, кодирующие переменную область легкой цепи (VL), и объединяли с константной областью человеческой легкой цепи (CL) (SK1, SEQ ID NO: 23). Указанные объединенные последовательности клонировали в экспрессионных векторах с использованием методов, известных специалистам в данной области.

20 Смесь экспрессионных векторов для тяжелой цепи и легкой цепи совместно интродуцировали в клетки HEK293 для экспрессии антител, и каждое антитело очищали из собранного супернатанта культуры, используя белок А или белок G, в соответствии с методами, известными специалистам в данной области. При необходимости дополнительно осуществляли гель-фильтрацию.

Пример 4

In vivo исследования антител против C1s

In vivo исследования с использованием обезьян циномоглус

Концентрацию антител и эндогенного C1s в плазме после введения антител
5 против C1s оценивали с опытах *in vivo*, в которых использовали 3-5 -летних
обезьян циномоглус, родившихся в Камбоджи (фирма SNBL, Ltd.). Антитела
против C1s вводили в дозе 10 мг/кг, используя одноразовый шприц и
интегрированную иглу, в головную вену предплечья. Введение осуществляли со
10 скоростью 0,5 мл/кг/мин или 2 мл/мин. При применении COS0637pHv2-SG1077R
образцы крови собирали до введения, через 5 мин после введения, 2 ч после
введения, 8 ч после введения, 1 день после введения, 2 дня после введения, 4 дня
после введения, 7 дней после введения, 14 дней после введения, 21 день после
введения, 28 дней после введения, 42 дня после введения и 56 дней после
15 введения. При применении других антител образцы крови собирали также через
10 дней после введения. Кровь брали из бедренной вены с помощью шприца,
предварительно заполненного гепарином натрия. Кровь немедленно охлаждали
на льду, а затем центрифугировали (4°C, 1700× g, 5 мин или 10 мин) для
получения плазмы. Плазму подвергали криоконсервации в морозильной камере
шоковой заморозки (приемлемый диапазон: -70°C или менее). Для исследования
20 использовали четыре антитела против C1s: COS0637pHv2-SG1077R,
COS0637pHv3-SG1077R, COS0637pHv8-SG1077R и COS0637pHv2-FcgSil.

Измерение концентрации антитела в плазме методом электрохемилюминесценции (ECL)

Концентрации COS0637pHv2-SG1077R и COS0637pHv2-FcgSil в плазме
25 обезьян циномоглус измеряли методом ECL. Мышиные антитела против Fc IgG
человека (фирма SouthernBiotech, 9040-01) распределяли в 96-луночный планшет
MULTI-ARRAY (фирма Meso Scale Discovery) и давали выстояться при
комнатной температуре в течение 1 ч для иммобилизации. Для получения
образцов для стандартной кривой и образцов плазмы обезьян циномоглус
30 использовали 100-кратное разведение или более. Стандартную кривую получали,
используя концентрации 0,410, 1,02, 2,56, 6,40, 16,0, 40,0 и 100 мкг/мл в плазме
обезьян циномоглус. После промывки планшета, на котором были
иммобилизованы антитела против Fc IgG человека, в планшет добавляли

разведенные образцы и содержимое перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. После промывки планшета добавляли биотинилированные антитела против IgG человека (фирма Bethyl Laboratories, A80-319A) и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. После промывки планшета добавляли меченный сульфо-меткой (SULFO-TAG) стрептавидин (фирма Meso Scale Discovery) и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. После промывки планшета в планшет немедленно добавляли Read Buffer T (×2) (фирма Meso Scale Discovery) и считывали сигналы с использованием устройства SECTOR Imager 2400 (фирма Meso Scale Discovery). Концентрацию каждого антитела рассчитывали с использованием оценочного программного обеспечения SOFTmax PRO (фирма Molecular Devices), основываясь на сигналах стандартной кривой. Изменения концентраций антител в плазме, обнаруженные при осуществлении измерений указанным методом, представлены на фиг. 1-1.

Измерение концентрации антитела в плазме с помощью жидкостной хроматографии высокого разрешения-ионизации электроспреем-танDEMной масс-спектрометрии (ЖХ/ESI-МС/МС)

Концентрации COS0637pHv3-SG1077R и COS0637pHv8-SG1077R в плазме обезьян циномоглус измеряли с помощью ЖХ/ESI-МС/МС. Для получения стандартной кривой использовали концентрации 0,781, 1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25,0 и 50 мкг/мл в плазме обезьян циномоглус. По 2 мкл образцов для получения стандартной кривой и образцов плазмы добавляли к 50 мкл магнитных гранул (Magnosphere MS300/ Low Carboxyl, фирма JSR), на которых иммобилизованы специфически связывающиеся с ними антитела COS0637pHv3-SG1077R или COS0637pHv8-SG1077R, и встряхивали при 25°C в течение 1,5 ч. Магнитные гранулы в образцах промывали 3 раза с помощью 0,2 мл ЗФР, содержащего 0,05% Твин 20, а затем промывали 0,2 мл ЗФР. Магнитные гранулы суспендировали в 24 мкл бикарбоната аммония (50 ммоль/л), содержащего 7,5 моля/л мочевины, 8 ммоль/л дитиотреитола и 0,1 мкг /мл лизоцима (белок куриных яиц), а затем встряхивали при 56°C в течение 45 мин. Затем добавляли 2 мкл йодацетамида (500 ммоль/л) и встряхивали при 37°C в течение 30 мин без доступа света. Затем добавляли 160 мкл бикарбоната аммония (50 ммоль/л), содержащего 0,5 мкг/мл модифицированного трипсина с чистотой, пригодной для секвенирования (фирма Promega). Образцы встряхивали при 37°C в течение

16 ч, а затем реакцию прекращали, добавляя 5 мкл 10% трифторуксусной кислоты. Для анализа с помощью ЖХ/ESI-МС/МС использовали 50 мкл расщепленных ферментом образцов. Для ЖХ/ESI-МС/МС-анализа применяли трехкврупольный масс-спектрометр Xevo TQ-S (фирма Waters), соединенный с устройством для сверхэффективной жидкостной хроматографии (UPLC) I-класса (фирма Waters). Специфический для антитела против C1s пептид NQVSLTC(карбамидометил)LVK обнаруживали путем мониторинга выбранных реакций (SRM). SRM-"перехода" был следующим: родительский ион антитела против C1s $[M+2H]^{2+}$ (m/z 581,3), дочерний ион у⁷-ион (m/z 820,4). Внутреннюю калибровочную стандартную кривую получали методом взвешенной линейной регрессии $1/x^2$ с использованием концентрации и площади пика. Концентрацию антител в плазме обезьян циномогус рассчитывали с помощью оценочного программного обеспечения Masslynx, версия 4.1 (фирма Waters). Изменения концентраций антител в плазме, обнаруженные при осуществлении измерений указанным методом, представлены на фиг. 1-1.

Измерение концентрации эндогенного C1s в плазме с помощью жидкостной хроматографии высокого разрешения-ионизации электроспреем-тандемной масс-спектрометрии (ЖХ/ESI-МС/МС)

Концентрацию C1s в плазме обезьян циномогус измеряли с помощью ЖХ/ESI-МС/МС. Для получения стандартной кривой использовали концентрации C1s в плазме циномогус, составляющие 0,477, 0,954, 1,91, 3,82, 7,63, 15,3 и 30,5 мкг/мл, которые получали путем разведения C1r2s2 циномогус мышинной плазмой. Образец плазмы обезьян циномогус разводили в 5 раз, используя мышиную плазму. По 2 мкл образцов для получения стандартной кривой и образцов плазмы смешивали с 26 мкл смешанного раствора бикарбоната аммония (50 ммоль/л)(содержащего 7,5 моля/л мочевины/ 100 ммоль/л дитиотреитола/10 мкг /мл лизоцима (белок куриных яиц)/100 мкг/мл человеческого C1s = 20/2/2/2), а затем встряхивали при 56°C в течение 45 мин. Человеческий C1s применяли в качестве внутреннего стандарта. Затем добавляли 2 мкл йодацетамида (50 ммоль/л) и встряхивали при 37°C в течение 30 мин без доступа света. Затем добавляли 160 мкл бикарбоната аммония (50 ммоль/л), содержащего 0,5 мкг/мл модифицированного трипсина с чистотой, пригодной для секвенирования (фирма Promega). Образцы встряхивали при 37°C

в течение 16 ч, а затем реакцию прекращали, добавляя 5 мкл 10% трифторуксусной кислоты. Для анализа с помощью ЖХ/ESI-МС/МС использовали 50 мкл расщепленных ферментом образцов. Для ЖХ/ESI-МС/МС-анализа применяли трехкврупольный масс-спектрометр Xevo TQ-S (фирма Waters), соединенный с UPLC I-класса (фирма Waters). Специфический для C1s циномоглус пептид LLEVPEAR обнаруживали путем мониторинга выбранных реакций (SRM). SRM-"перехода" был следующим: родительский ион антитела против C1s $[M+2H]^{2+}$ (m/z 463,8), дочерний ион у⁶-ион (m/z 700,4). Внутреннюю калибровочную стандартную кривую получали методом взвешенной линейной регрессии $1/x^2$ с использованием концентрации и площади пика. Концентрацию C1s в плазме обезьян циномоглус рассчитывали с помощью оценочного программного обеспечения Masslynx, версия 4.1 (фирма Waters). Изменения концентраций C1s в плазме, обнаруженные при осуществлении измерений указанным методом, представлены на фиг. 1-2.

15 Воздействие зависимости антител от pH и подавленной способности связываться с FcγR на концентрацию антител против C1s и ингибирующую комплемент активность у обезьян циномоглус

Три антитела против C1s (COS0637pHv2-, COS0637pHv3- и COS0637pHv8-SG1077R), имеющие Fc-области с изменениями, которые усиливают связывание с обезьяньими FcγRIIa и FcγRIIb, снижали концентрация C1s в плазме на 18,9%-26,4% максимум через 2 дня после введения по сравнению с концентрацией до их введения (фиг. 1-2). Однако эти антитела исчезали быстрее по сравнению с обычными терапевтическими антителами в виде IgG (фиг. 1-1), и установлено, что наряду со снижением концентрации антител в плазме через 14 дней после введения, общая концентрация C1s вновь возрастала. Однако для антител COS0637pHv3- и COS0637pHv8-SG1077R с улучшенной зависимостью от pH касательно их связывания с антигеном, обнаружено улучшение ФК антител по сравнению с COS0637pHv2- SG1077R. Об этом свидетельствует то, что ингибирующая комплемент активность, достигаемая при введении COS0637pHv3- и COS0637pHv8-SG1077R, сохранялась в течение 14 дней и 21 дня после введения, хотя активность, достигаемая при введении COS0637pHv2-SG1077R, сохранялась всего вплоть до 7 дней после введения. И таким образом, продемонстрирована длительная нейтрализация антигена и длительное

ингибирование комплемента антителами COS0637pHv3- и COS0637pHv8-SG1077R (фиг. 4).

При этом, установлено, что антитело против C1s, имеющее Fc-области с изменениями, которые снижают связывание с обезьяньими Fc γ R, т.е.

5 COS0637pHv2-FcgSil, отличалось хорошей ФК по сравнению с антителами с изменениями, обуславливающими усиление связывания с обезьяньими Fc γ RIIa и Fc γ RIIb (фиг. 1-1). Ингибирующая комплемент активность, достигаемая при введении COS0637pHv2-FcgSil, сохранялась вплоть до 14 дней после введения (фиг.4). Общая концентрация C1s, обнаруженная после введения COS0637pHv2-FcgSil, снижалась лишь максимум до 75,5% по сравнению с концентрацией до
10 введения (фиг. 1-2); при этом, установлено, что благодаря улучшению ФК по сравнению с COS0637pHv2-SG1077R, достигалась длительная нейтрализация антигена и длительная ингибирующая комплемент активность.

Пример 5

15 Анализы связывания в различных условиях pH с помощью Biacore®

Связывающую способность каждого образца при pH 7,4 и pH 6,0 определяли при 37°C, используя устройство BIACORE® T200 (фирма Cytiva). Сначала антитело против человеческого C1r2s2 IPN009VH2Vk3-SG1148 (IPN009) иммобилизовывали на всех проточных ячейках сенсорного чипа CM5 с
20 помощью набора для аминного сочетания, тип 2 (фирма Cytiva). Буфер, содержащий 20мМ ACES, 150мМ NaCl, 1,2мМ CaCl₂, 1 мг/мл БСА (не содержащий IgG), 1 мг/мл CMD, 0,05% Tween® 20, 0,005% (мас./об.) NaN₃, pH 7,4 или pH 6,0 применяли в качестве подвижного буфера. Затем тетрамеры рекомбинантного человеческого C1r2s2 (hC1r2s2) и тетрамеры рекомбинантного
25 C1r2s2 циномоглус (суC1r2s2), полученные так, чтобы они имели ответ в виде связывания, соответствующий 100 резонансным единицам (RU), захватывали на сенсорной поверхности посредством IPN009. К ним добавляли раствор антитела со скоростью 30 мкл/мин в течение 120 с, затем добавляли подвижный буфер со скоростью 30 мкл/мин в течение 180 с и рассчитывали константу диссоциации
30 (K_D) каждого антитела в отношении hC1r2s2 и суC1r2s2. Для того, чтобы рассчитать величину K_D при pH 7,4, инъецировали растворы антитела, полученные с использованием подвижного буфера с pH 7,4 до получения концентраций 0, 0,8, 1,6, 3,1, 6,3, 13нМ, а для того, чтобы рассчитать величину

5 K_D при pH 6,0, инъецировали растворы антитела, разведенные с использованием подвижного буфера с pH 6,0 до получения концентраций 0, 6,3, 12,5, 25, 50, 100нМ. Сенсорную поверхность регенерировали в каждом цикле, используя 3М $MgCl_2$ (приготовлен в лаборатории заявителей). Величину K_D рассчитывали, используя оценочное программное обеспечение BIACORE® T200, версия 2.0 (фирма Cytiva). Силу связывания в условиях каждого pH сравнивали путем деления величины K_D при pH 6,0 на величину K_D при pH 7,4. (таблица 4)

Таблица 4. Связывающая активность антител с человеческим C1r2s2 в кислых условиях и нейтральных условиях

hC1r2s2			
Обозначение антитела	KD (моль/л)		KD(pH 6,0)/KD(pH 7,4)
	pH 6,0	pH 7,4	
COS0637pHv8-TT91R	1.25E-08	2.49E-10	50.2
COS0637pHv3-TT91R	1.03E-08	3.88E-10	26.5
COS0637pHv15-G1A3FcgSil+LowpI	3.18E-07	3.99E-10	797.0
COS0637pHv16-G1A3FcgSil+LowpI	2.92E-08	1.81E-10	161.3
COS0637pHv17-G1A3FcgSil+LowpI	3.29E-08	2.30E-10	143.0
COS0637pHv21-G1A3FcgSil+LowpI	3.13E-08	2.60E-10	120.4
COS0637pHv23-G1A3FcgSil+LowpI	2.74E-08	2.49E-10	110.0
COS0637pHv25-G1A3FcgSil+LowpI	2.13E-08	1.98E-10	107.6
COS0637pHv8-G1A3FcgSil+LowpI	1.93E-08	2.72E-10	71.0

10

Представлены величины KD, характеризующие связывание с человеческим C1r2s2 при pH 6,0 и pH 7,4, рассчитанные с помощью Biacore, и соотношение величины KD при pH 6,0 и величины KD при pH 7,4.

Таблица 5. Связывающая активность антител в отношении C1r2s2

циномолгус в кислых условиях и нейтральных условиях

cyC1r2s2			
Обозначение антитела	KD (моль/л)		KD (pH 6,0) / KD (pH 7,4)
	pH 6,0	pH 7,4	
COS0637pHv8-TT91R	2.33E-08	3.45E-10	67.5
COS0637pHv3-TT91R	2.20E-08	5.02E-10	43.8
COS0637pHv15-G1A3FcgSil+Lowpl	1.11E-07	4.92E-10	225.6
COS0637pHv16-G1A3FcgSil+Lowpl	9.12E-08	1.96E-10	465.3
COS0637pHv17-G1A3FcgSil+Lowpl	1.06E-07	2.52E-10	420.6
COS0637pHv21-G1A3FcgSil+Lowpl	6.29E-08	3.46E-10	181.8
COS0637pHv23-G1A3FcgSil+Lowpl	4.63E-08	3.34E-10	138.6
COS0637pHv25-G1A3FcgSil+Lowpl	6.71E-08	2.43E-10	276.1
COS0637pHv8-G1A3FcgSil+Lowpl	3.03E-08	3.65E-10	83.0

5 Представлены величины KD, характеризующие связывание с обезьяньим C1r2s2 при pH 6,0 и pH 7,4, рассчитанные с помощью Biacore, и соотношение величины KD при pH 6,0 и величины KD при pH 7,4.

Пример 6

Оценка антител против C1s в отношении C1q-вытеснительной функции

10 C1q-вытеснительную функцию антител изучали при 37°C методом захвата C1r2s2, используя устройство BIACORE® T200 (фирма Cytiva). Антитело против человеческого C1r2s2 IPN009VH2Vk3-SG1148 иммобилизовывали на сенсорном чипе CM5 с помощью набора для аминного сочетания, тип 2 (фирма Cytiva).
 15 Антитела, тетрамеры рекомбинантного человеческого C1r2s2 (hC1r2s2) и нативный человеческий C1q (фирма CompTech, hC1q) приготавливали в подвижном буфере с pH 7,4 (20мМ ACES, 150мМ NaCl, 1,2мМ CaCl₂, 1 мг/мл БСА (не содержащий IgG), 1 мг/мл CMD, 0,05% Tween® 20, 0,005% (мас./об.) NaN₃, pH 7,4). Сначала hC1r2s2 захватывали на сенсорном чипе посредством
 20 IPN009VH2Vk3-SG1148. В качестве уровня захвата выбирали 200 резонансных единиц (RU). Затем, инъецировали hC1q, разведенный в подвижном буфере до получения концентрации 100нМ, и немедленно после этого инъецировали

раствор антитела, разведенный подвижным буфером до концентрации 500нМ, со скоростью 10 мкл/мин в течение 1500 с. Сенсорную поверхность регенерировали в каждом цикле, используя 3М MgCl₂ (приготовлен в лаборатории заявителей). Результаты представлены на фиг. 2-1 - 2-14. Сенсограммы получали, используя оценочное программное обеспечение BIACORE® T200, версия 2.0 (фирма Cytiva). Жирными линиями обозначены сенсограммы, полученные, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали буфер (C1r2s2+C1q): сенсограмма 1; и они отражают образование комплекса C1qrs на поверхности сенсорного чипа (ниже обозначена как сенсограмма 1). Пунктирными линиями обозначены сенсограммы, полученные, когда hC1q инъецировали к hC1r2s2, а затем инъецировали антитело (C1r2s2+C1q+Ат), и они отражают воздействие антител на комплексы C1qrs на поверхности сенсорного чипа (ниже обозначена как сенсограмма 2). Ломаными линиями обозначены сенсограммы, полученные, когда hC1q не инъецировали к hC1r2s2, а инъецировали только антитела (C1r2s2+Ат), и они иллюстрируют связывание антител с hC1r2s2 только на поверхности сенсорного чипа (ниже обозначена как сенсограмма 3). На фиг. 2-1 - 2-14 представлены сенсограммы 1-3. Для сравнения указанных сенсограмм ответ в виде связывания C1r2s2 стандартизовали относительно 100 RU.

Антитела против C1s связывались с C1qrs и поэтому, начиная с момента времени после добавления C1q, представленный на сенсограмме ответ возрастал по мере добавления антител. Касательно антител против C1s, которые не обладали функцией вытеснения C1q, начиная с момента времени после добавления C1q, представленный на сенсограмме ответ возрастал по мере добавления антител, и количество единиц ответа практически не изменялось в момент прекращения добавления антитела (цитировано по: WO 2019/198807, фиг. 2А, COS0583).

Касательно антител, которые обладали функцией вытеснения C1q, начиная с момента времени после добавления C1q, представленный на сенсограмме ответ возрастал по мере добавления антител; однако количество единиц ответа в момент прекращения добавления антитела оказалось ниже по сравнению с единицами ответа при добавлении только буфера после добавления C1q, или степень уменьшения единиц ответа в момент прекращения добавления антитела

по отношению ко времени непосредственно после начала добавления антитела выше, чем степень уменьшения при добавлении только буфера.

Из сенсограммы 3 на фиг. 2-1 - 2-14 следует, что каждое Ат стабильно связывалось с C1r2s2 в отсутствии C1q. Из сенсограммы 1 следует, что C1q стабильно связывалось с C1r2s2 в отсутствии Ат. Кроме того, для большинства антител количество единиц ответа в момент прекращения добавления антител на сенсограмме 2 оказался ниже, чем на сенсограмме 1, и для некоторых антител степень уменьшения единиц ответа в момент прекращения добавления антител по отношению ко времени непосредственно после начала добавления антител на сенсограмме 2 оказалась выше, чем степень уменьшения на сенсограмме 1. Представленные выше результаты свидетельствуют о том, что все модифицированные антитела обладали способностью обеспечивать диссоциацию C1q из комплекса C1qgs.

Пример 7

15 Оценка изоэлектрической точки (pI) антител против C1s

4.1. Измерение изоэлектрической точки (pI) антитела против C1s с помощью капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF)

Для осуществления сIEF применяли систему Maurice (фирма Protein simple) с капиллярным картриджем. Применяемые анолит и католит представляли собой 20 0,08М фосфат, содержащий 0,1% (мас./об.) метилцеллюлозы (МЦ) и 0,1М гидроксид натрия, содержащий 0,1% (мас./об.) МЦ, соответственно. Все анализируемые образцы содержали рабочие растворы, включающие 0,2 мг/мл антитела, 0,35 % (мас./об.) МЦ, 6,0мМ IDA (имидоуксусная кислота), 10мМ аргинин, 0,5% (мас./об.) pI-маркера 5,85 и 0,5% (мас./об.) pI-маркера 9,99 и 25 об.% фармалита 8-10.5 и 2 об.% фармалита 5-8. Все образцы интенсивно перемешивали и кратковременно центрифугировали перед загрузкой в отсек автосамплера. После фокусирования образцов при напряжении 1,5 кВ в течение 1 мин осуществляли фокусирование при напряжении 3,0 кВ в течение 8 мин. Отсек автосамплера выдерживали при 10°C. Измерения повторяли дважды для 30 каждого образца и величины pI каждого образца получали путем расчета среднего значения для n=2 измерений. Рассчитанные величины pI представлены в таблице 6.

Таблица 6. Измеренные величины pI каждого из антител против C1s, имеющих Fc-области с пониженной pI и подавленным связыванием с FcγR

Обозначение антитела	pI (среднее значение по n=2 измерениям)
COS0637pHv8-TT91R	9.0
COS0637pHv8-G1A3FcγSil+LowpI	7.7
COS0637pHv15-G1A3FcγSil+LowpI	7.5
COS0637pHv16-G1A3FcγSil+LowpI	7.8
COS0637pHv17-G1A3FcγSil+LowpI	7.8
COS0637pHv21-G1A3FcγSil+LowpI	7.6
COS0637pHv23-G1A3FcγSil+LowpI	7.6
COS0637pHv25-G1A3FcγSil+LowpI	7.8

5 Представлены величины pI каждого антитела, измеренные с помощью системы Maurice (фирма Protein simple). Величина pI представляет собой среднюю величину, полученную для двух измерений.

Пример 8

Подтверждение связывания с FcγR

10 Способность каждого образца связываться с FcγR при pH 7,4 определяли при 25°C, используя устройство BIACORE® T200 (фирма Cytiva). Сначала белок L (фирма BioVision) иммобилизовывали на всех проточных ячейках сенсорного чипа CM4, используя набор для амминного сочетания, тип 2 (фирма Cytiva). В качестве подвижного буфера применяли 50мМ фосфатный буфер (pH 7,4),
 15 содержащий 150мМ NaCl, 0,05% Tween® 20, и антитела, полученные так, чтобы их ответ в виде связывания соответствовал 500 RU или 2000 RU, захватывали на сенсорной поверхности. Инъецировали человеческие или обезьяньи FcγR, разбавленные подвижным буфером, и оценивали уровень связывания с антителами. hFcγRIa и суFcγRIa разводили до концентрации 8нМ, а остальные
 20 рецепторы разводили до 1000нМ. Сенсорную поверхность регенерировали в каждом цикле, используя 10мМ раствор гидрохлорида глицина, pH 1,5 (получен в лаборатории заявителей). Исходя из полученных результатов измерений, рассчитывали уровень связывания FcγR, деленный на уровень связывания

каждого захваченного антитела (связывание/захват), используя оценочное программное обеспечение BIACORE® T200, версия 2.0 (фирма Cytiva) (таблица 7 и таблица 9). Кроме того, полученные на основе этих результатов уровни связывания/захвата других образцов, представлены в таблицах (таблица 8 и таблица 10), в которых уровень связывания/захвата, установленный для герцептина (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.) (человеческий IgG1/каппа), принимали за 1.

Таблица 7. Уровень ответа в виде связывания с человеческими FcγR на 1 RU захваченного антитела

		hFcγR Ia	hFcγR IIa_167 H	hFcγR IIa_167 R	hFcγR IIb	hFcγR IIIa_17 6F	hFcγR IIIa_17 6V	hFcγR IIIb_N A1	hFcγR IIIb_N A2
hFcγR (связывание/ захват)	Герцептин	0.20	0.06	0.05	0.01	0.04	0.10	0.01	0.02
	COS0637pHv8- G1A3FcγSil+LowpI	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Представлены уровни связывания/захвата для человеческих FcγR, рассчитанные с помощью Biacore.

Таблица 8. Относительное связывание с человеческими FcγR

		hFcγR Ia	hFcγR IIa_16 7H	hFcγR IIa_16 7R	hFcγR IIb	hFcγR IIIa_17 6F	hFcγR IIIa_17 6V	hFcγR IIIb_N A1	hFcγR IIIb_N A2
hFcγR (относит. уровень связывания /захвата)	Герцептин	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	COS0637pHv8- G1A3FcγSil+LowpI	0.00	-0.01	-0.01	-0.08	-0.05	-0.02	-0.12	-0.07

Исходя из уровней связывания/захвата для человеческих FcγR, рассчитанных с использованием Biacore, рассчитывали относительное связывание разрабатываемых антител в сравнении с герцептином.

Таблица 9. Уровень ответа в виде связывания с FcγR циномоглус на 1 RU

захваченного антитела

		суFcγR Ia	суFcγR IIa1	суFcγR IIa2	суFcγR IIa3	суFcγR IIb	суFcγR IIIa(R)	суFcγR IIIa(S)
суFcγR (связывание/ захват)	Герцептин	0.22	0.02	0.02	0.01	0.03	0.12	0.13
	COS0637pHv8- G1A3FcγSil+LowpI	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	COS0637pHv2- SG1077R	0.02	0.05	0.05	0.03	0.08	0.01	0.01
	COS0637pHv2-FcγSil	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

- 5 Представлены уровни связывания/захвата для обезьяньих FcγR, рассчитанные с помощью Biacore.

Таблица 10. Относительное связывание с FcγR циномоглус

		суFcγR Ia	суFcγR IIa1	суFcγR IIa2	суFcγR IIa3	суFcγR IIb	суFcγR IIIa(R)	суFcγR IIIa(S)
суFcγR (относит. уровень связывания /захвата)	Герцептин	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	COS0637pHv8- G1A3FcγSil+LowpI	0.00	-0.01	-0.04	-0.09	-0.01	-0.01	-0.01
	COS0637pHv2- SG1077R	0.07	2.16	2.55	4.47	2.74	0.07	0.08
	COS0637pHv2-FcγSil	0.00	0.00	-0.02	-0.06	0.00	-0.01	-0.01

- 10 Исходя из уровней связывания/захвата для обезьяньих FcγR, рассчитанных с использованием Biacore, рассчитывали относительное связывание разрабатываемых антител в сравнении с герцептином.

Пример 9

Исследования *in vivo* с использованием обезьян циномоглус

- 15 Исследования проводили с помощью методов, аналогичных описанным в примере 4. Для введения использовали два антитела против C1s, COS0637pHv16-G1A3FcγSil+LowpI и COS0637pHv21-G1A3FcγSil+LowpI.

Измерение концентрации антитела в плазме с помощью жидкостной хроматографии высокого разрешения-ионизации электроспреем-тандемной масс-спектрометрии (ЖХ/ESI-МС/МС)

Концентрации COS0637pHv16-G1A3FcgSil+LowpI и COS0637pHv21-G1A3FcgSil+LowpI в плазме обезьян циномолгус измеряли с помощью ЖХ/ESI-МС/МС. Для получения стандартной кривой использовали концентрации 0,781, 1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25,0 и 50 мкг/мл в плазме обезьян циномолгус. По 2 мкл образцов для получения стандартной кривой и образцов плазмы добавляли к 50 мкл магнитных гранул (Magnosphere MS300/ Low Carboxyl, фирма JSR), на которых иммобилизованы специфически связывающиеся с ними антитела COS0637pHv16-G1A3FcgSil+LowpI или COS0637pHv21-G1A3FcgSil+LowpI, и после центрифугирования встряхивали при 25°C в течение 1,5 ч. Магнитные гранулы в образцах промывали 3 раза с помощью 0,2 мл ЗФР, содержащего 0,05% Твин 20, а затем промывали 0,2 мл ЗФР. Магнитные гранулы суспендировали в 24 мкл бикарбоната аммония (50 ммоль/л), содержащего 7,5 моля/л мочевины, 8 ммоль/л дитиотреитола и 0,1 мкг/мл лизоцима (белок куриных яиц), и смесь встряхивали при 56°C в течение 45 мин. Затем добавляли 2 мкл йодацетамида (500 ммоль/л) и смесь встряхивали при 37°C в течение 30 мин без доступа света. Затем добавляли 160 мкл бикарбоната аммония (50 ммоль/л), содержащего 0,5 мкг/мл модифицированного трипсина с чистотой, пригодной для секвенирования (фирма Promega). Образцы встряхивали при 37°C в течение ночи, а затем реакцию прекращали, добавляя 5 мкл 10% трифторуксусной кислоты. Для анализа с помощью ЖХ/ESI-МС/МС использовали 50 мкл расщепленных ферментом образцов. Для ЖХ/ESI-МС/МС-анализа применяли трехкврупольный масс-спектрометр Xevo TQ-S (фирма Waters), соединенный с устройством UPLC I-класса (фирма Waters). Специфический для антитела против C1s пептид GPSVFPLAPSSR обнаруживали с помощью мониторинга выбранных реакций (SRM). SRM-"перехода" был следующим: родительский ион антитела против C1s $[M+2H]^{2+}$ (m/z 607,8), дочерний ион у⁷-ион (m/z 727,4). Внутреннюю калибровочную стандартную кривую получали методом взвешенной линейной регрессии $1/x^2$ с использованием концентрации и площади пика. Концентрацию антител в плазме обезьян циномолгус рассчитывали с помощью оценочного программного

обеспечения Masslynx, версия 4.1 (фирма Waters). Изменения концентраций антител в плазме, обнаруженные при осуществлении измерений указанным методом, представлены на фиг. 3-1.

5 Измерение концентрации эндогенного C1s в плазме с помощью жидкостной хроматографии высокого разрешения-ионизации электроспреем-тандемной масс-спектрометрии (ЖХ/ESI-МС/МС)

Концентрацию C1s в плазме обезьян циномогус измеряли с помощью ЖХ/ESI-МС/МС. Для получения стандартной кривой использовали концентрации C1s в плазме обезьян циномогус, составляющие 0,477, 0,954, 10 1,91, 3,82, 7,63, 15,3 и 30,5 мкг/мл, которые получали путем разведения C1r2s2 циномогус мышинной плазмой. Образцы плазмы обезьян циномогус разводили в 5 раз, используя мышиную плазму. По 2 мкл образцов для получения стандартной кривой и образцов плазмы смешивали с 26 мкл смешанного раствора бикарбоната аммония (50 ммоль/л)(содержащего 7,5 моля/л мочевины/ 15 100 ммоль/л дитиотреитола/10 мкг/мл лизоцима (белок куриных яиц)/100 мкг/мл человеческого C1s = 20/2/2/2), а затем смесь встряхивали при 56°C в течение 45 мин. Человеческий C1s применяли в качестве внутреннего стандарта. Затем добавляли 2 мкл йодацетамида (50 ммоль/л) и встряхивали при 37°C в течение 30 мин без доступа света. Затем добавляли 160 мкл бикарбоната 20 аммония (50 ммоль/л), содержащего 0,5 мкг/мл модифицированного трипсина с чистотой, пригодной для секвенирования (фирма Promega). Образцы встряхивали при 37°C в течение 16 ч, а затем реакцию прекращали, добавляя 5 мкл 10% трифторуксусной кислоты. Для анализа с помощью ЖХ/ESI-МС/МС использовали 50 мкл расщепленных ферментом образцов. Для ЖХ/ESI-МС/МС- 25 анализа применяли трехкврупольный масс-спектрометр Xevo TQ-S (фирма Waters), соединенный с устройством для сверхэффективной жидкостной хроматографии (UPLC) I-класса (фирма Waters). Специфический для C1s циномогус пептид LLEVPEAR обнаруживали с помощью мониторинга выбранных реакций (SRM). SRM-"перехода" был следующим: родительский ион антитела против C1s $[M+2H]^{2+}$ (m/z 463,8), дочерний ион y^6 -ион (m/z 700,4). 30 Внутреннюю калибровочную стандартную кривую получали методом взвешенной линейной регрессии $1/x^2$ с использованием концентрации и площади пика. Концентрацию C1s в плазме обезьян циномогус рассчитывали с помощью

оценочного программного обеспечения Masslynx, версия 4.1 (фирма Waters).
Изменения концентраций C1s в плазме, обнаруженные при осуществлении
измерений указанным методом, представлены на фиг. 3-2.

5 Воздействие зависимости антител от pH и величины pI на концентрацию
антител против C1s и ингибирующую комплемент активность у обезьян
циномолгус

В антитела против C1s, содержащие Fc-области с изменениями, которые
уменьшали связывание с обезьяньими FcγR, вносили дополнительные изменения
для улучшения зависимости от pH при связывании с антигеном и уменьшения pI
10 антител, с получением COS0637pHv16-G1A3FcγSil+LowpI и COS0637pHv21-
G1A3FcγSil+LowpI, и определяли изменения в концентрациях антител и
антигенов. Касательно изменений в концентрации C1s после введения антител,
никаких значительных различий не обнаружено по сравнению с вариантом, в
котором вводили COS0637pHv2-FcγSil. При этом, концентрация антител через
15 56 дней после введения оказалось в 20 или более раз выше, чем концентрация
COS0637pHv2-FcγSil, и обнаружены значительные улучшения ФК. Достигнутая
после введения каждого антитела ингибирующая комплемент активность
сохранялась по меньшей мере вплоть до 56 дней после введения (фиг. 4). Для
COS0637pHv16-G1A3FcγSil+LowpI и COS0637pHv21-G1A3FcγSil+LowpI
20 обнаружено значительное улучшение ФК и в результате длительная
нейтрализующая антиген и ингибирующая комплемент активность.

Пример 10

Оценка нейтрализующей комплемент функции у обезьян (ингибирующее
действие в отношении лизиса RBC)

25 Ингибирующую комплемент активность антител оценивали с помощью
указанного ниже метода, используя сенсibilизированные куриные эритроциты.
Плазму, собранную у обезьян, разводили до 10% с помощью буфера для анализа
(HBSS Ca²⁺ Mg²⁺, содержащий 0,05% БСА). Куриные эритроциты (фирма Japan
Bio Serum) сенсibilизировали с использованием антител к куриным
30 эритроцитам (фирма Rockland), подсчитывали их количество после промывки и
получали 1×10⁸ клеток/мл в буфере для анализа. Затем полученную из обезьян
плазму добавляли в количестве, равном количеству сенсibilизированных
куриных эритроцитов, и смесь инкубировали при 37°C в течение 7 мин для

лизиса эритроцитов. Конечная концентрация обезьяньей плазмы в указанной реакционной смеси составляла 5%. Реакцию прекращали, добавляя холодный буфер для анализа, содержащий EDTA. Указанную смесь центрифугировали до получения дебриса нелизированных клеток, супернатант собирали и

5 анализировали выделение свободного гемоглобина, используя абсорбцию (ОП) при 415 нм. Для расчета процента лизированных эритроцитов (%) лизис эритроцитов в присутствии плазмы до введения антитела принимали за 100%, процент лизиса в условиях без добавления плазмы принимали за 0%, и рассчитывали процент лизированных эритроцитов в каждый момент времени.

10 Использовали плазму из 3 обезьян, и в единицу времени оценивали по 1 лунке для каждого случая. На фиг. 4 данные представлены в виде среднего значения \pm SD для данных, которые оценивали как отрицательные касательно активности антитела.

Промышленная применимость

15 Установлено, что антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, с улучшенной ФК обладают C1s-нейтрализующей активностью и ингибирующей комплемент активностью в крови в течение длительного времени. Указанные антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять для

20 лечения или предупреждения опосредуемых комплементом заболеваний или нарушений.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое содержит антигенсвязывающую область и константную область антитела,

5 где антитело способствует диссоциации C1q от комплекса C1qrs и/или ингибирует связывание C1q с C1r2s2, и

в котором антигенсвязывающая область содержит комбинацию HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, выбранную из группы, которая состоит из участков, указанных ниже в подпунктах 1)-6):

10 1) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 60, 61 и 62 соответственно;

2) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 37, 38,
15 39, 56, 57 и 58 соответственно;

3) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 56, 57 и 58 соответственно;

4) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые
20 содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 48, 49 и 50 соответственно;

5) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 52, 53 и 54 соответственно; и

25 6) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 33, 34, 35, 56, 57 и 58 соответственно.

2. Антитело по п. 1, где антитело содержит переменную область тяжелой
30 цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), выбранную из группы, которая состоит из областей, указанных ниже в подпунктах 1)-6):

1) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 24 и 59 соответственно;

2) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 36 и 55 соответственно;

3) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 24 и 55 соответственно;

5 4) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 24 и 47 соответственно;

5) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 28 и 51 соответственно; и

10 6) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 32 и 55 соответственно.

3. Антитело по п. 1 или п. 2, для которого соотношение величины KD в диапазоне кислых значений pH и величины KD в диапазоне нейтральных значений pH, т.е. соотношение KD в кислой среде/ KD в нейтральной среде, составляет 10^7 или более.

4. Антитело по одному из п.п. 1-3, где антигенсвязывающая область может специфически связываться с доменом CUB1-EGF-CUB2 человеческого C1s.

20 5. Антитело по одному из п.п. 1-4, в котором антитело имеет мутантную константную область, содержащую по меньшей мере одно аминокислотное изменение, которое снижает связывающую активность в отношении Fcγ-рецептора.

25 6. Антитело по п. 5, в котором мутантная константная область содержит аминокислотное изменение по меньшей мере в одном из положений 235 и 236 согласно EU-нумерации.

30 7. Антитело по одному из п.п. 1-6, где антитело имеет мутантную константную область, содержащую по меньшей мере одно аминокислотное изменение, и в котором аминокислотное изменение снижает изоэлектрическую точку (pI) мутантной константной области по сравнению с изоэлектрической точкой родительской константной области.

8. Антитело по п. 7, в котором мутантная константная область содержит аминокислотное изменение по меньшей мере в одном из положений 137, 268, 274, 355 и 419 согласно EU-нумерации.

5

9. Антитело по одному из п.п. 1-8, где величина pI составляет 7,8 или менее.

10. Антитело по одному из п.п. 1-8, в котором константная область содержит константную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и константную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

15. 11. Антитело, обладающее связывающей активностью в отношении C1s, где антитело содержит комбинацию HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, выбранную из группы, которая состоит из участков, указанных ниже в подпунктах 1)-6):

20. 1) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 60, 61 и 62 соответственно;

2) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 37, 38, 39, 56, 57 и 58 соответственно;

25. 3) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 56, 57 и 58 соответственно;

30. 4) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 48, 49 и 50 соответственно;

5) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 52, 53 и 54 соответственно; и

6) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 33, 34, 35, 56, 57 и 58 соответственно.

5 12. Антитело по п. 11, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), выбранную из группы, которая состоит из областей, указанных ниже в подпунктах 1)-6):

1) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 24 и 59 соответственно;

10 2) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 36 и 55 соответственно;

3) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 24 и 55 соответственно;

15 4) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 24 и 47 соответственно;

5) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 28 и 51 соответственно; и

6) VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 32 и 55 соответственно.

20 13. Антитело по п. 11 или п. 12, где константная область антитела содержит константную область H-цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и константную область L-цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

25 14. Антитело, содержащее тяжелую цепь (H-цепь) и легкую цепь (L-цепь), выбранную из группы, которая состоит из цепей, указанных ниже в подпунктах 1)-6):

30 1) H-цепь и L-цепь, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 66 и 67 соответственно;

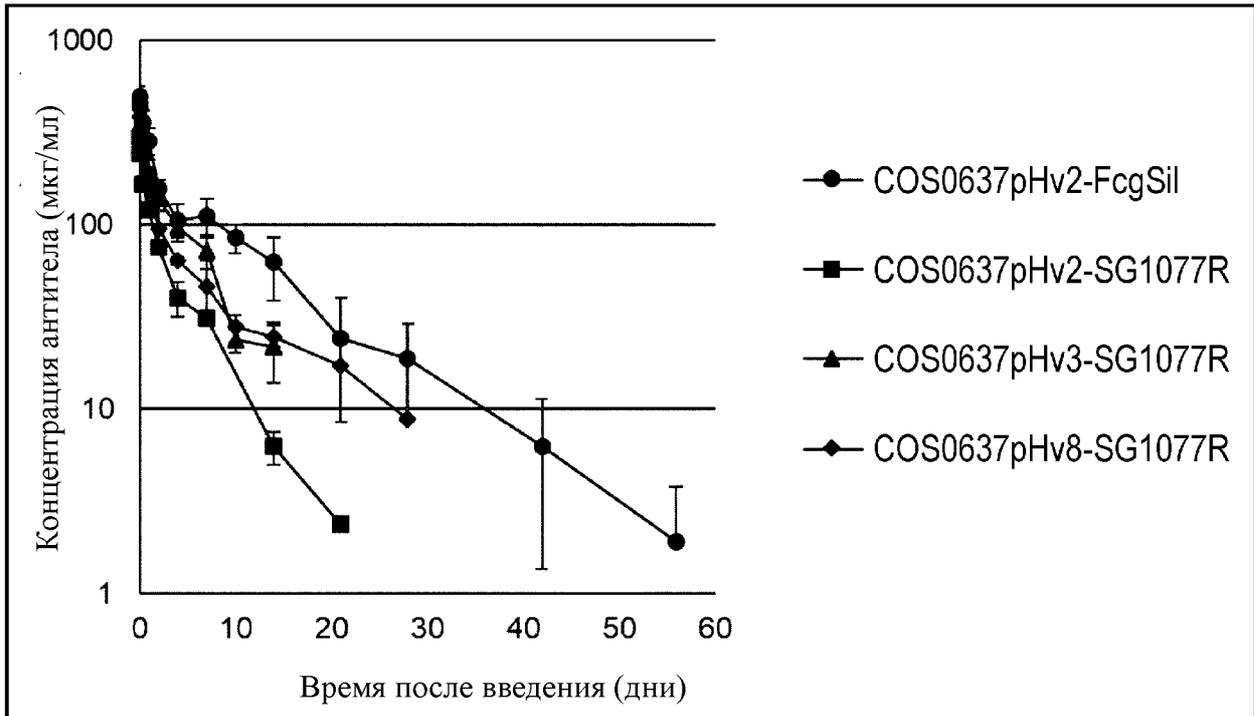
2) H-цепь и L-цепь, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 68 и 69 соответственно;

3) H-цепь и L-цепь, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 70 и 71 соответственно;

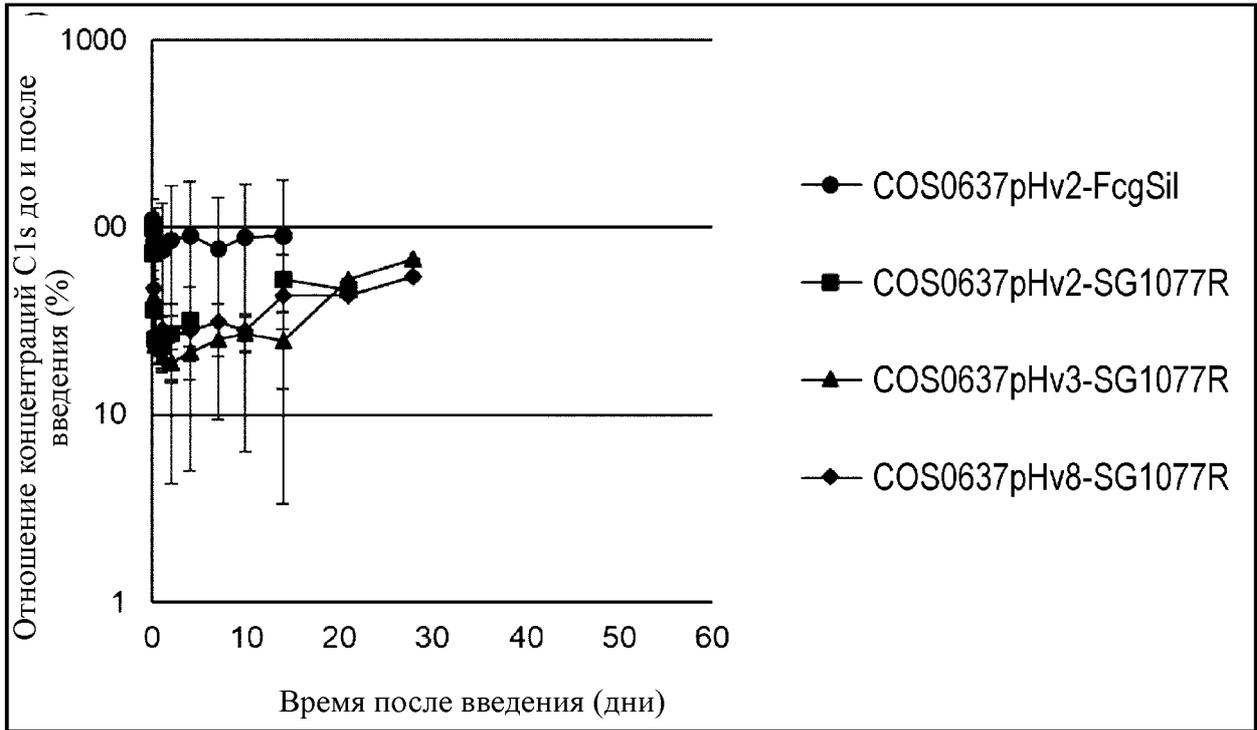
4) H-цепь и L-цепь, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 72 и 73 соответственно;

5) H-цепь и L-цепь, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 74 и 75 соответственно; и

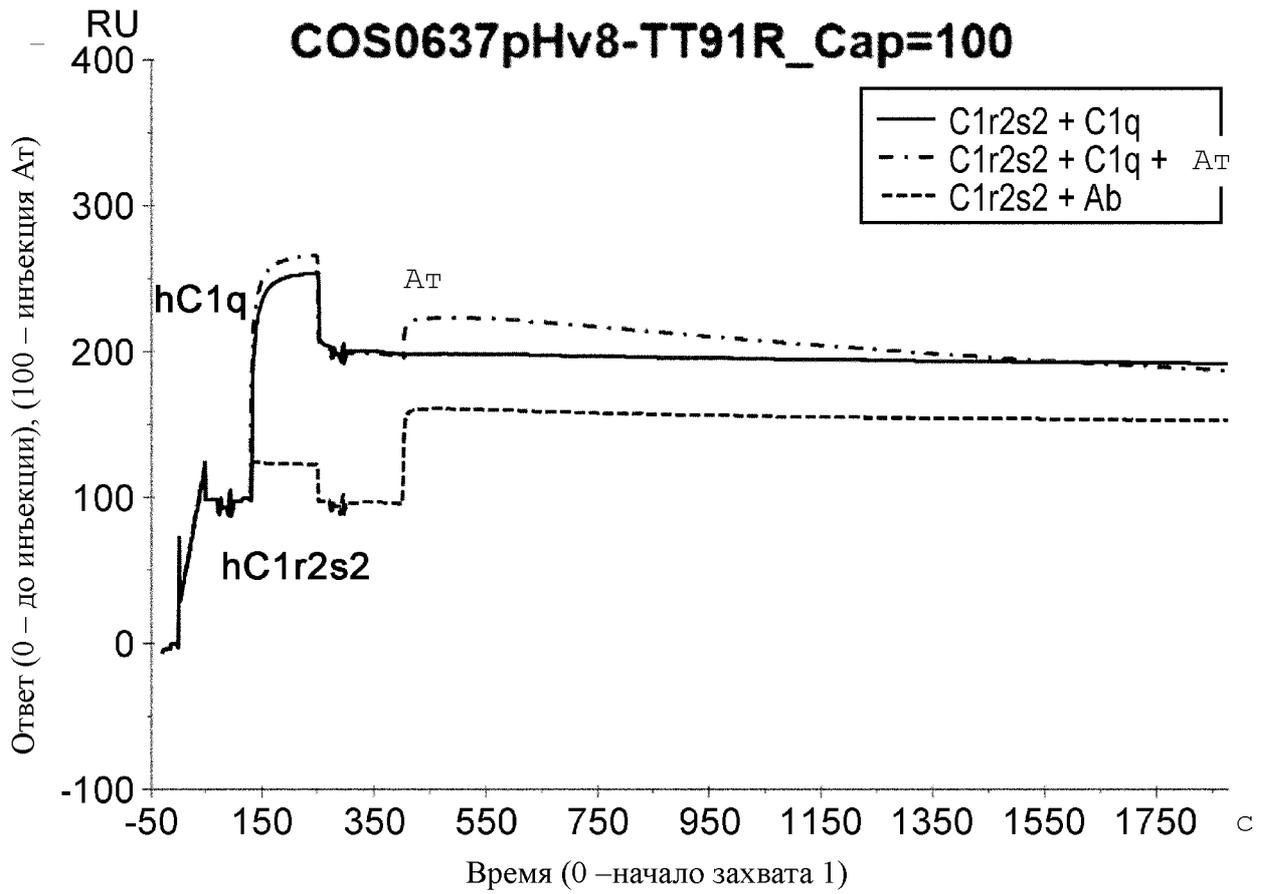
6) H-цепь и L-цепь, которые содержат аминокислотные последовательности, состоящие из SEQ ID NO: 76 и 77 соответственно.



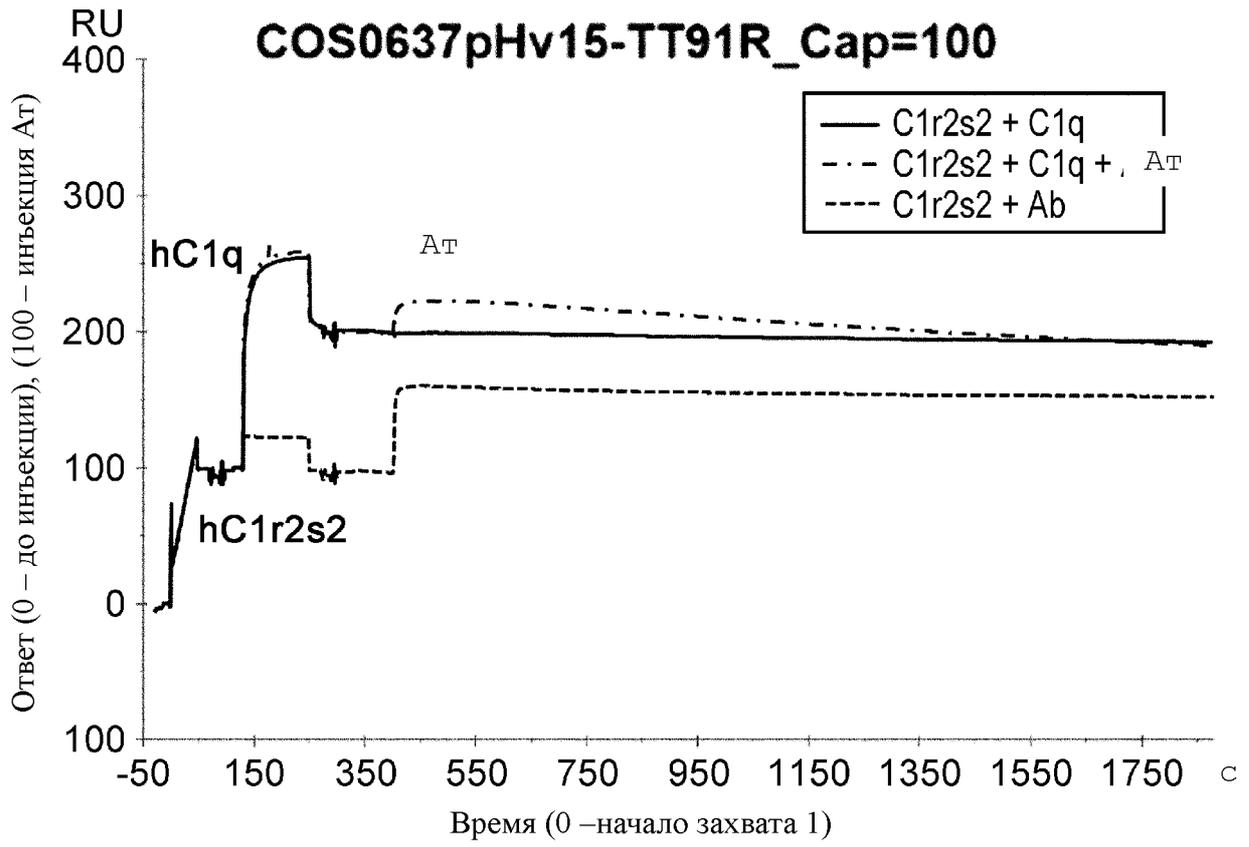
Фиг. 1-1



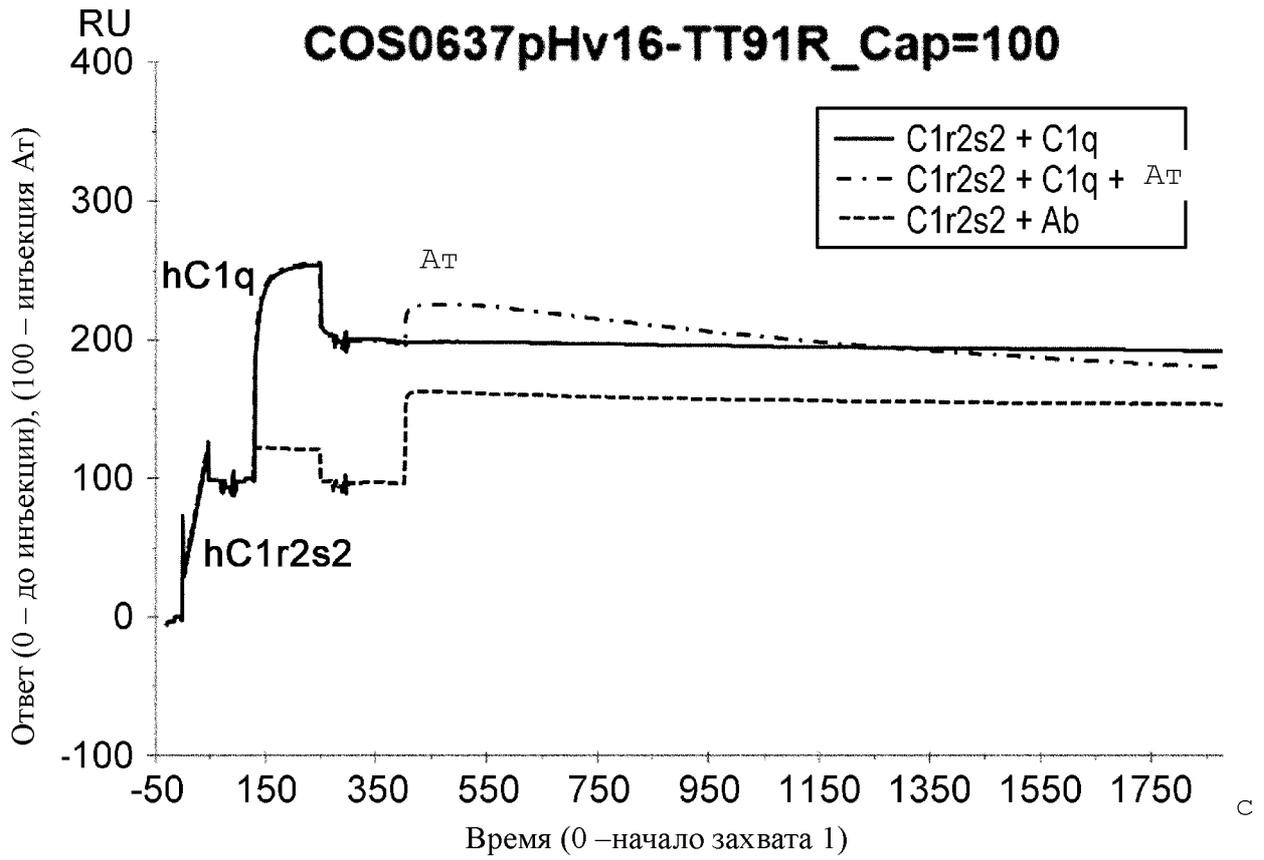
Фиг. 1-2



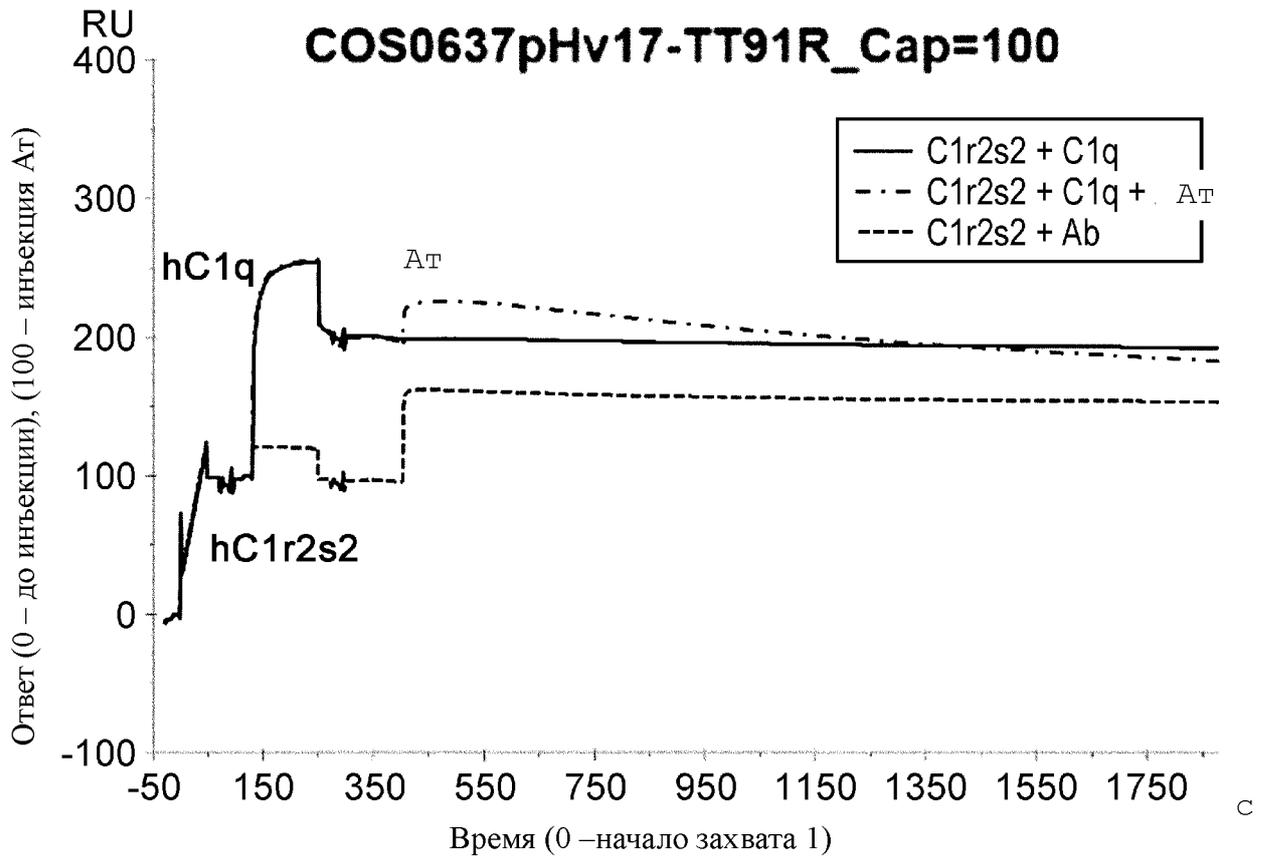
Фиг. 2-1



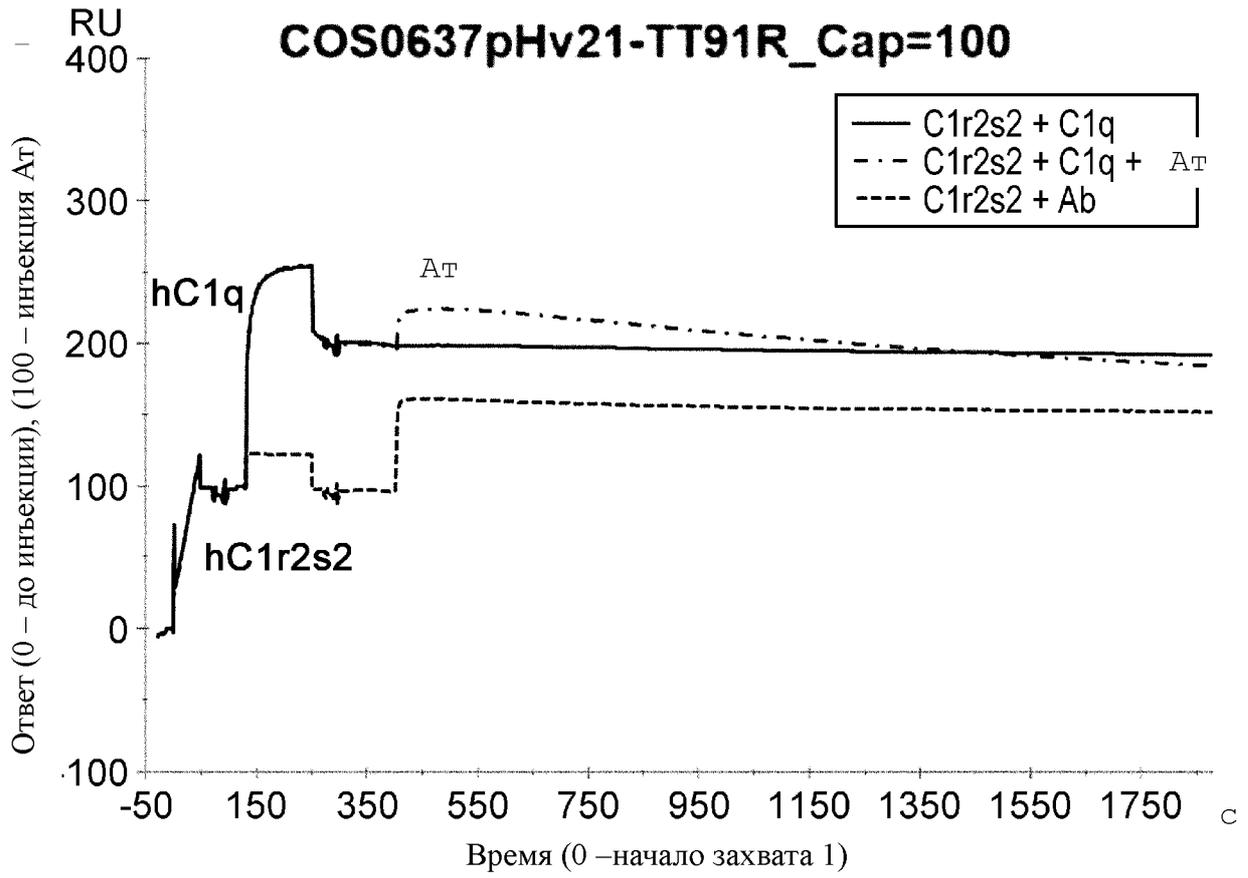
Фиг. 2-2



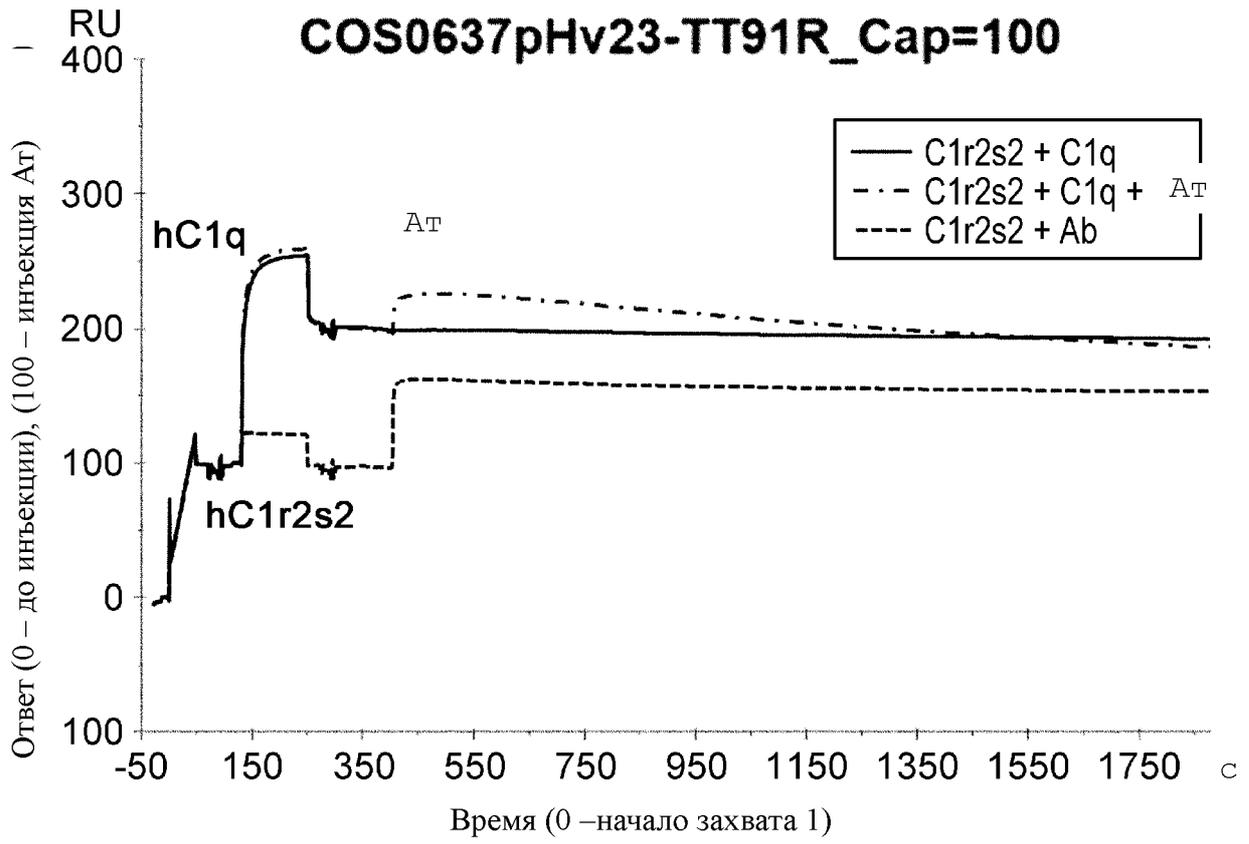
Фиг. 2-3



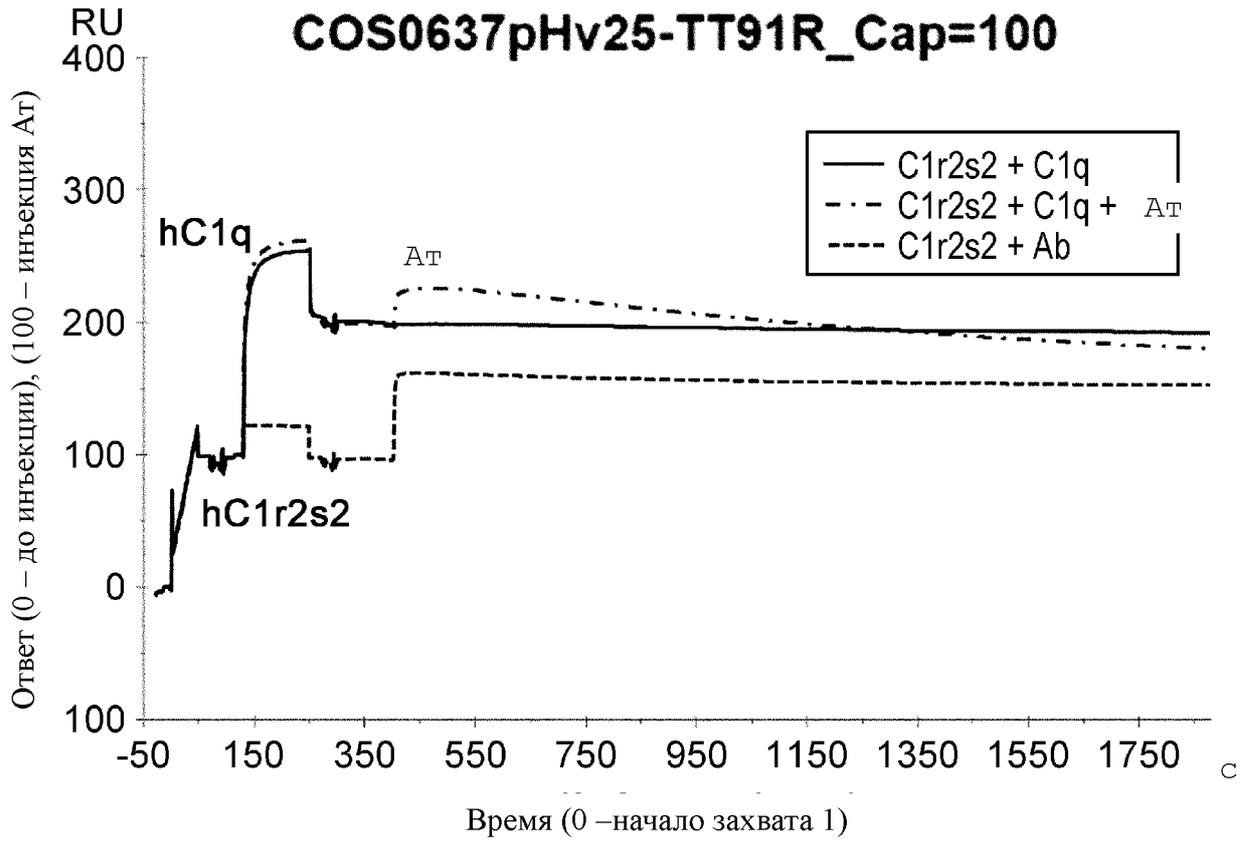
Фиг. 2-4



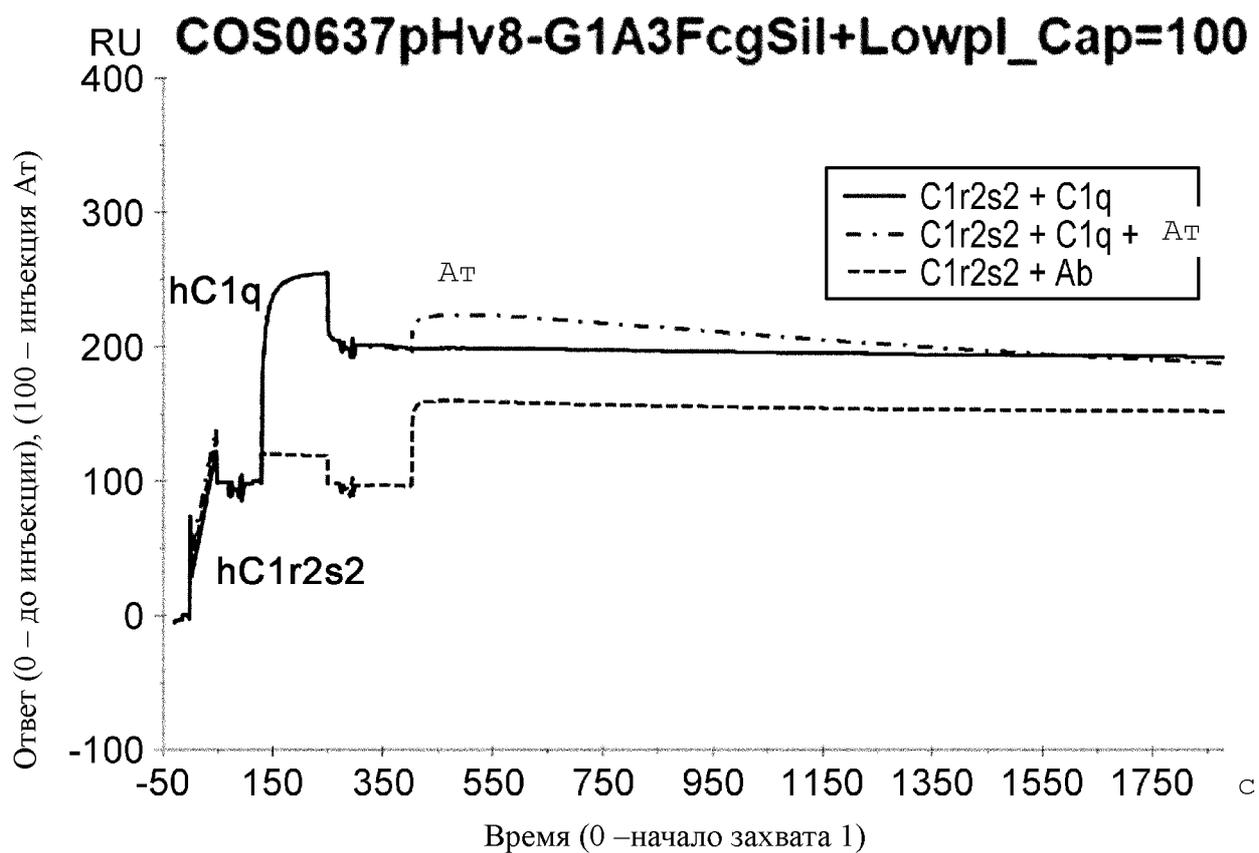
Фиг. 2-5



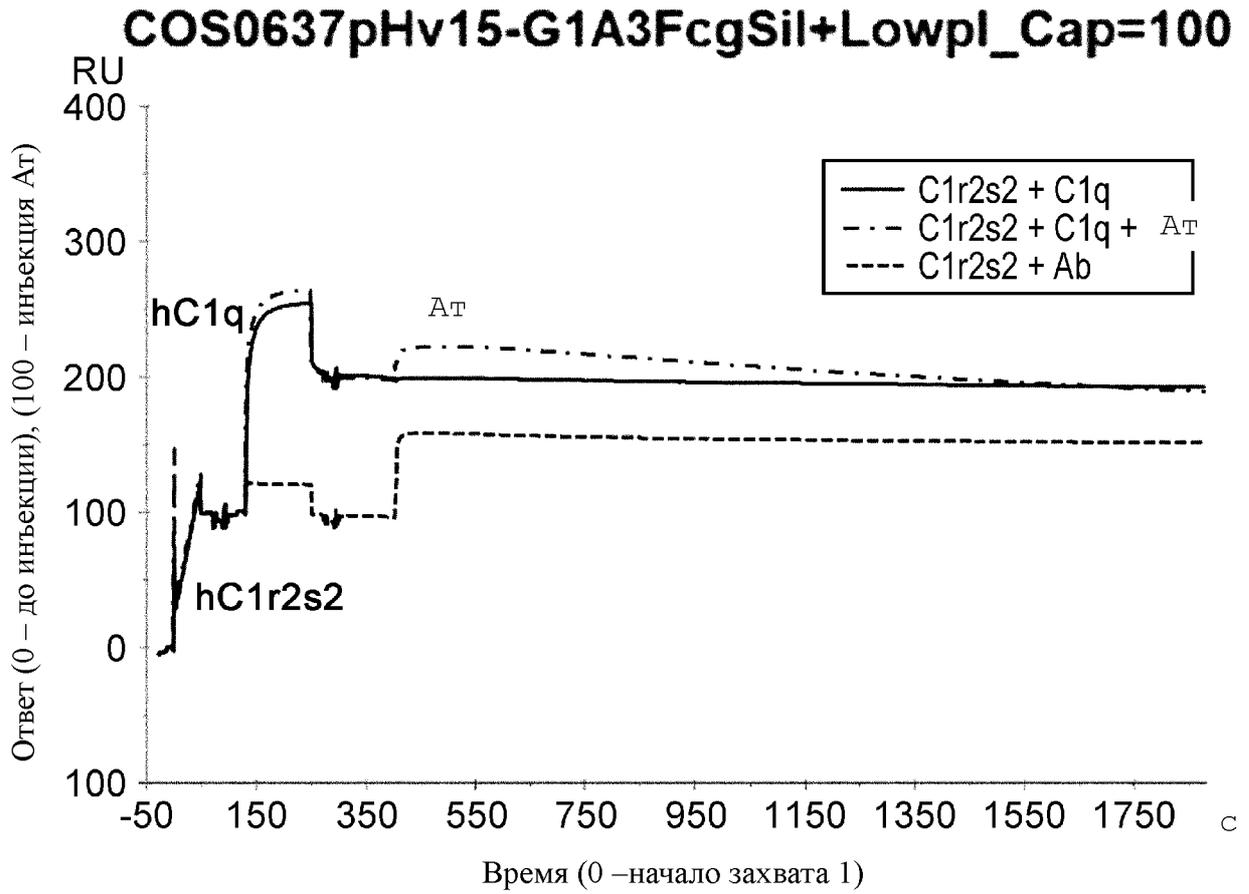
Фиг. 2-6



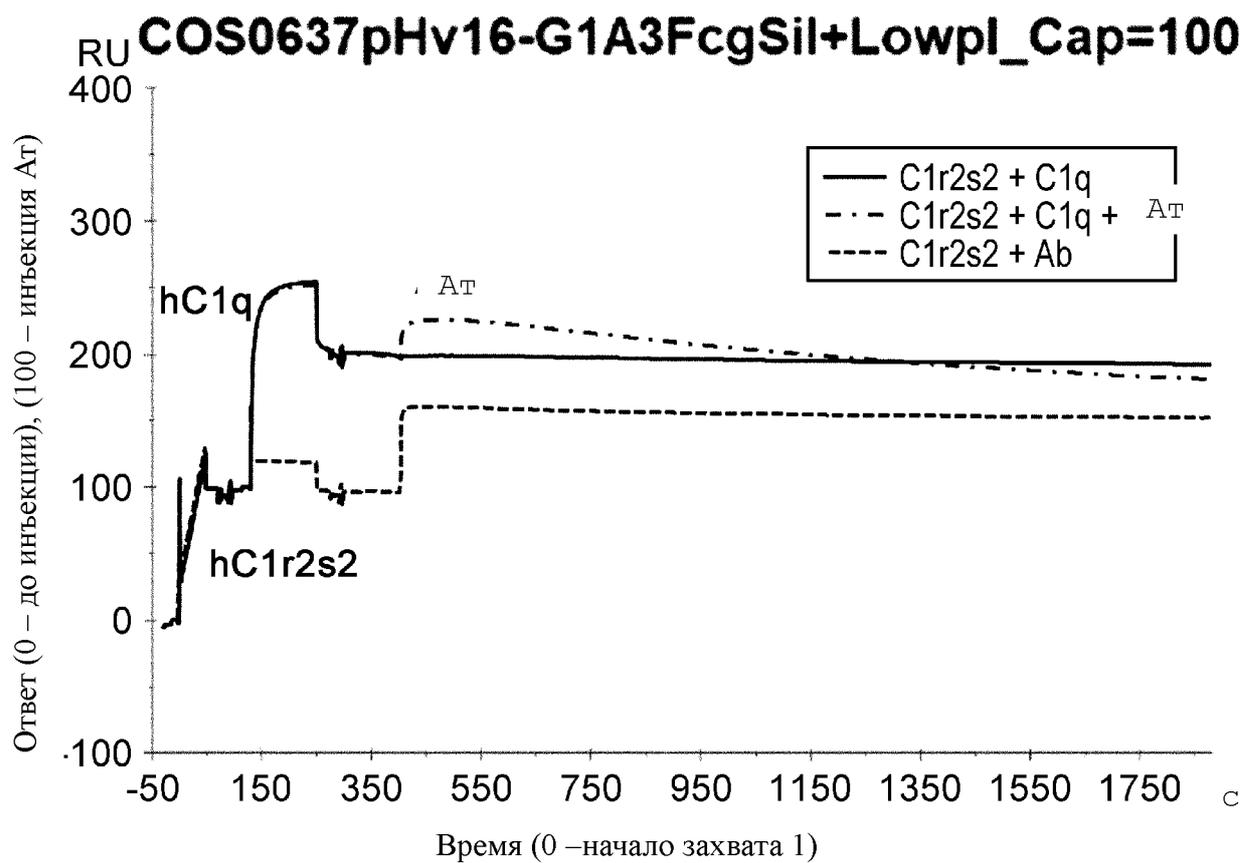
Фиг. 2-7



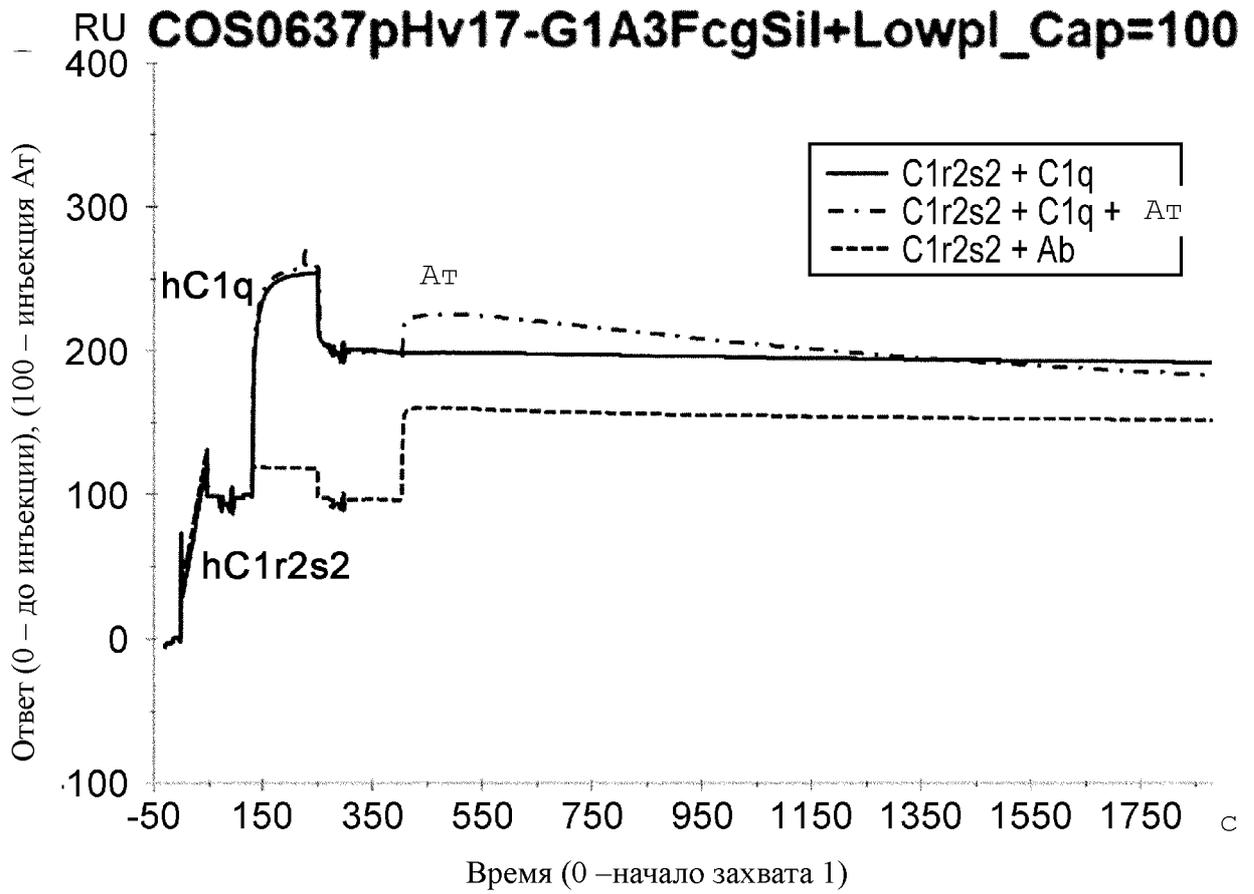
Фиг. 2-8



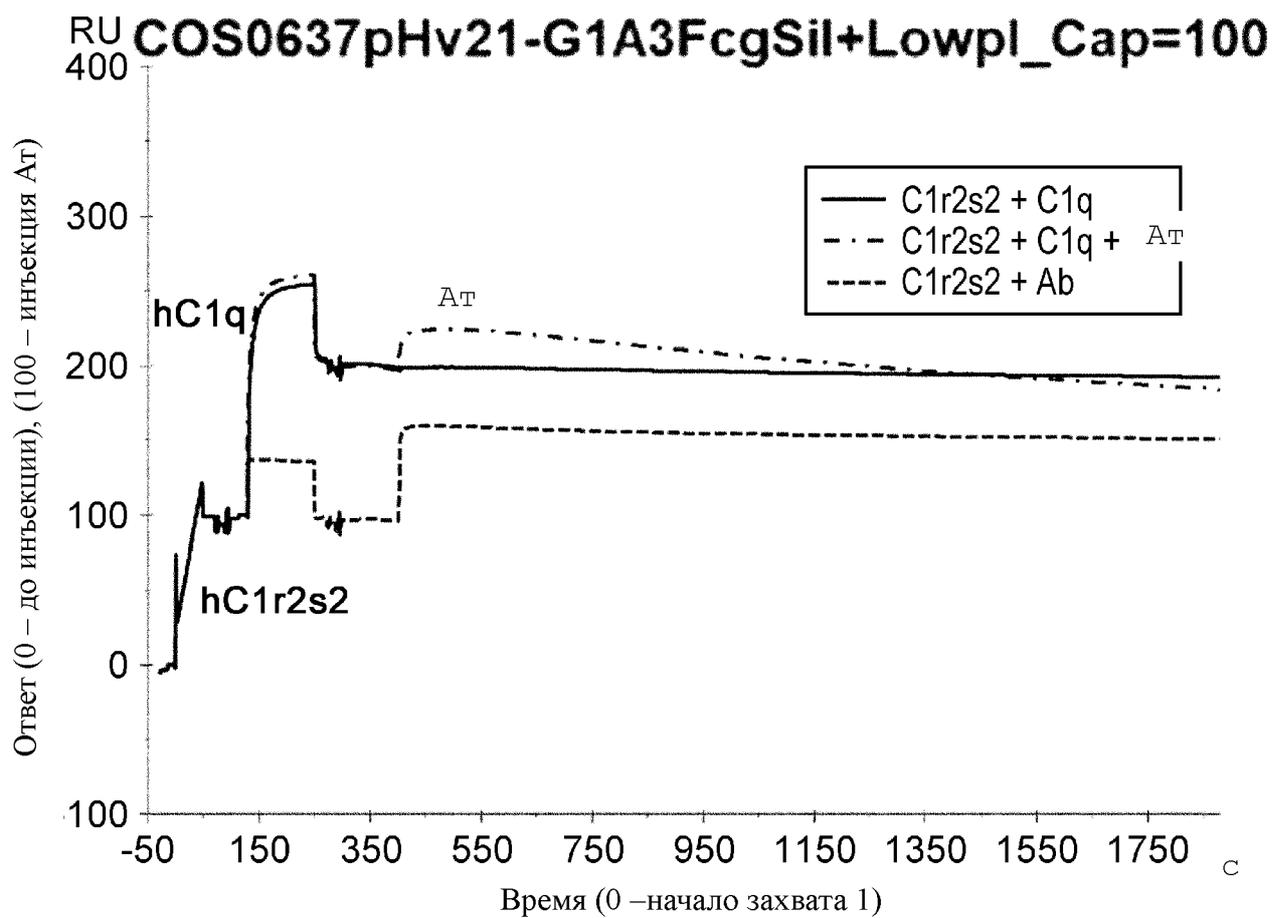
Фиг. 2-9



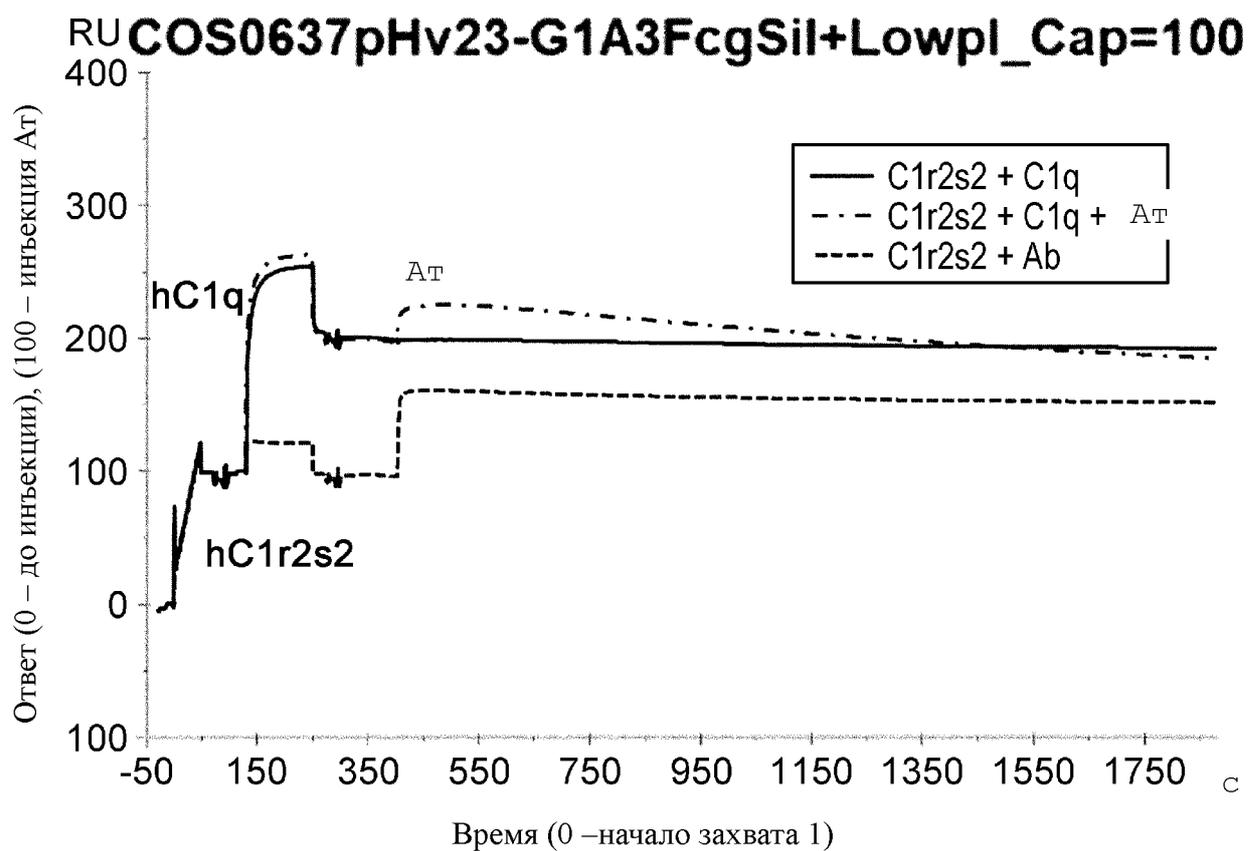
Фиг. 2-10



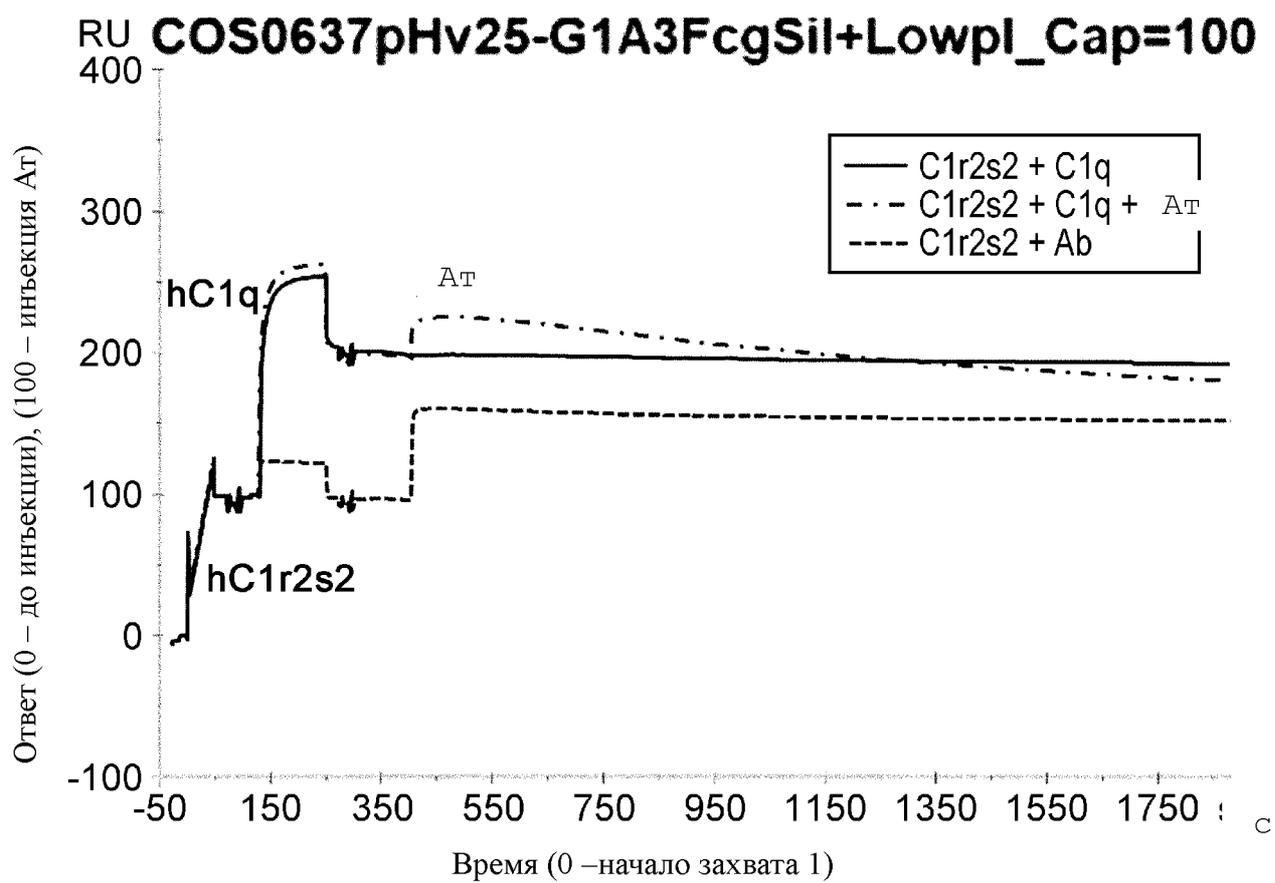
Фиг. 2-11



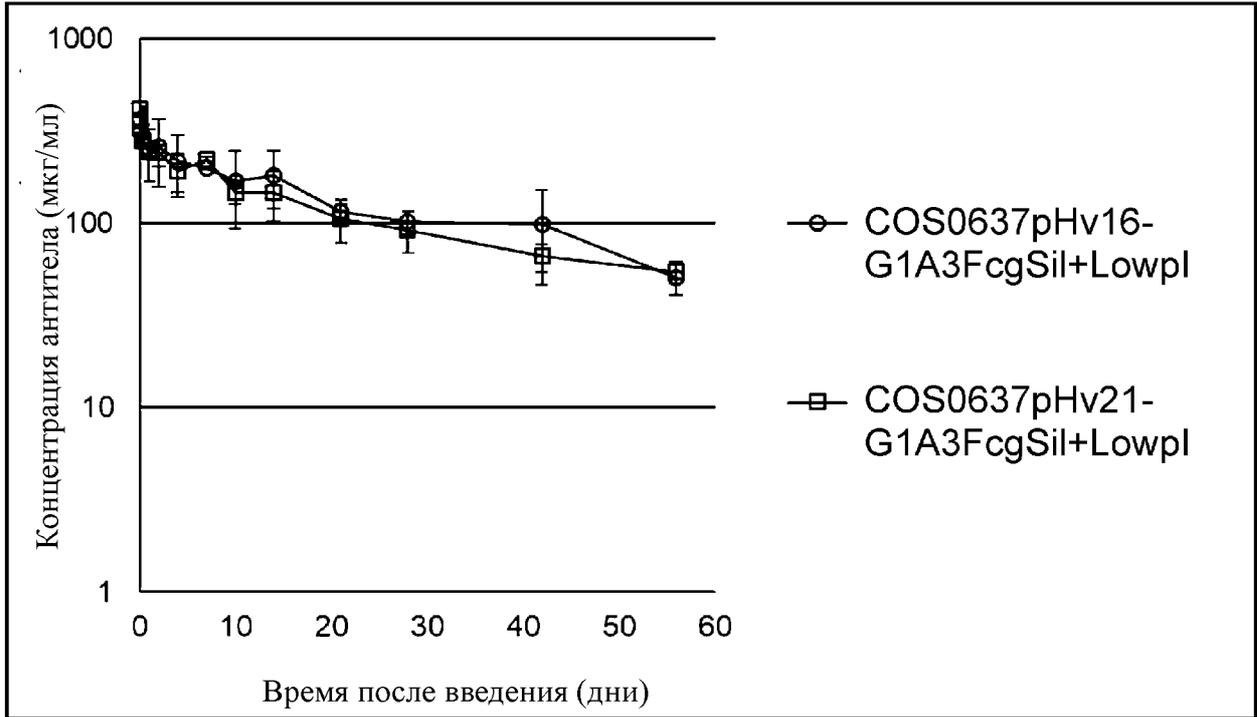
Фиг. 2-12



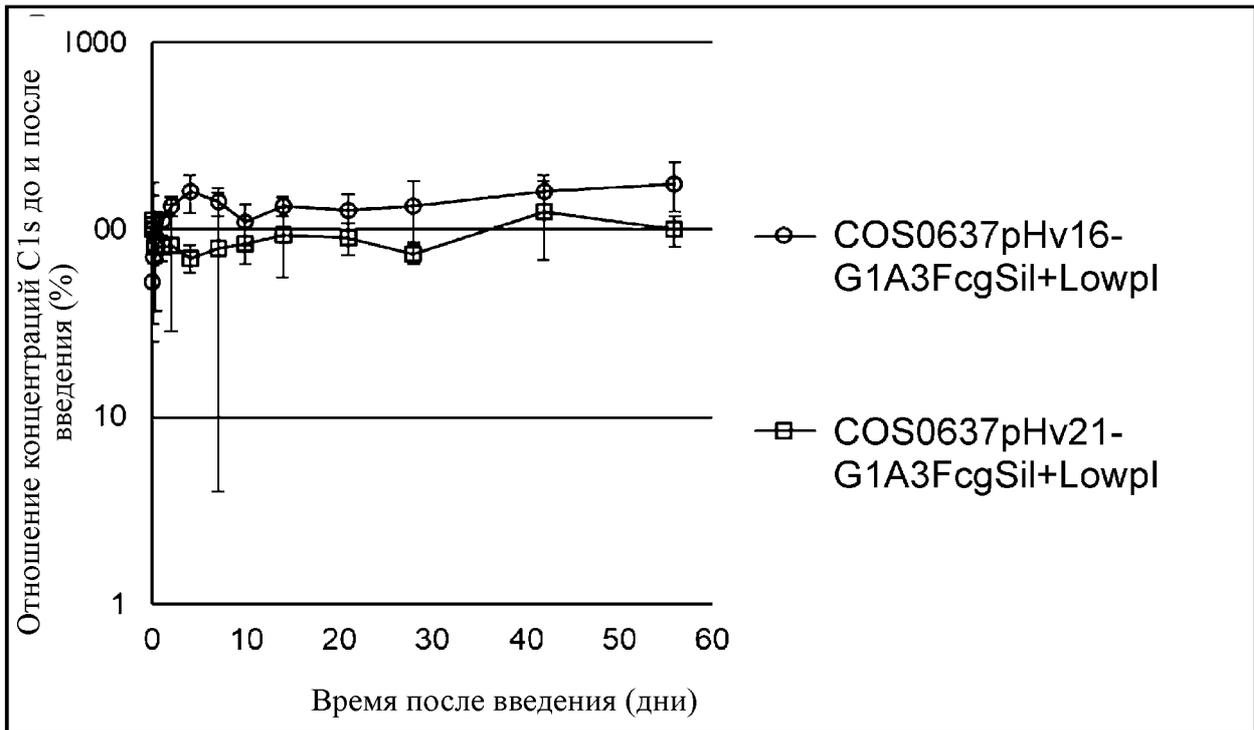
Фиг. 2-13



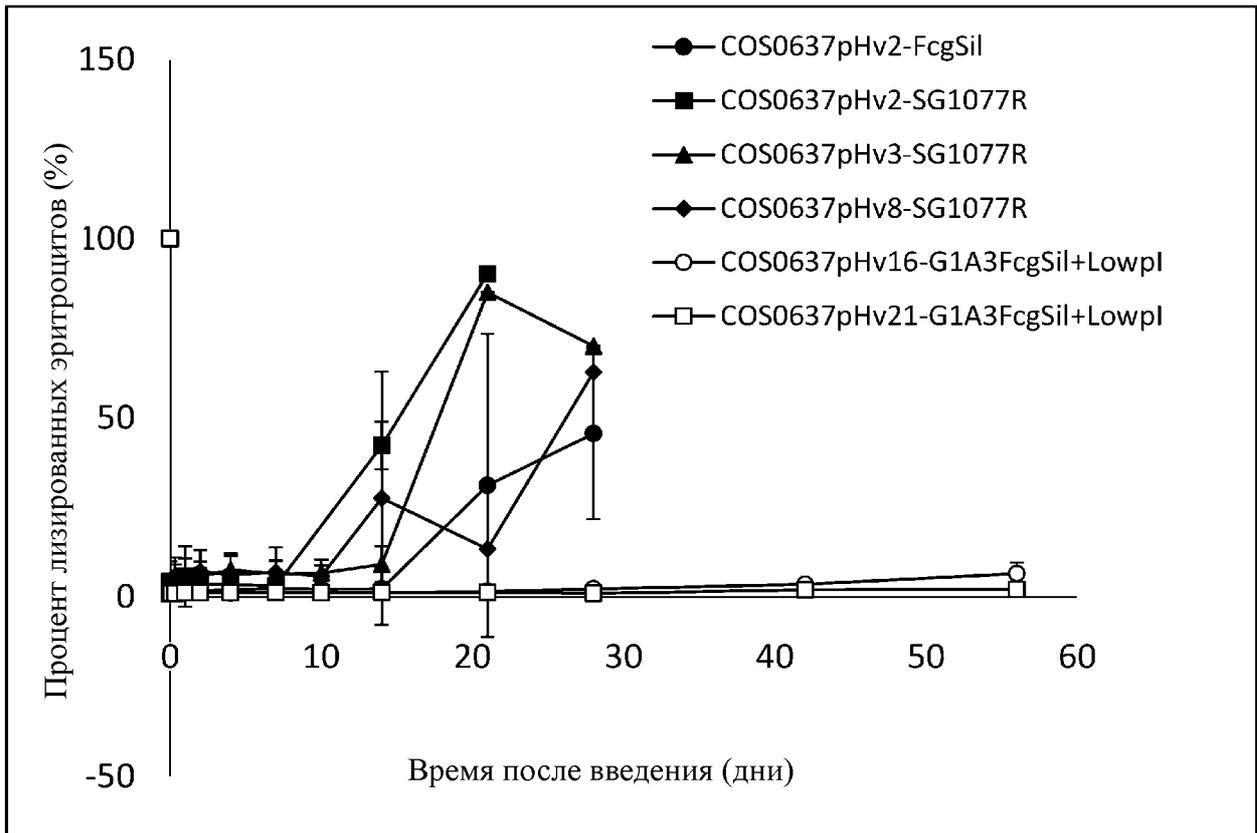
Фиг. 2-14



Фиг. 3-1



Фиг. 3-2



Фиг. 4