

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202491600 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.08.12

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

(22) Дата подачи заявки  
2022.12.21

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ С3 И ИХ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ФРАГМЕНТЫ, А ТАКЖЕ ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ГЛАЗ

(31) 63/292,513

(32) 2021.12.22

(33) US

(86) PCT/EP2022/087260

(87) WO 2023/118312 2023.06.29

(71) Заявитель:

СИ-ДИ-ЭР-ЛАЙФ АГ (СН);  
БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ  
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:

Боррас Леонардо (СН), Гупта  
Панкадж (US), Хёерер Штефан (DE),  
Юнгмихель Штефани, Лайснер  
Кристиан (СН), Райндль София (DE),  
Рихле Филипп Роберт, Шайфеле  
Фабиан, Соберай Анна (СН)

(74) Представитель:

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

(57) Настоящее изобретение относится к антителам и их фрагментам, нацеленным на комплемент С3. Более конкретно, к антителам против С3 и к способам применения для лечения различных заболеваний или расстройств.

A1

202491600

202491600

A1

АНТИТЕЛА ПРОТИВ С3 И ИХ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ФРАГМЕНТЫ, А  
ТАКЖЕ ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ГЛАЗ

5

Область, к которой относится изобретение

[001] Настоящее изобретение в целом относится к антителам и их фрагментам, нацеленным на комплемент С3. Более конкретно, раскрыты антитела против С3 и их антигенсвязывающие фрагменты, а также способы применения для лечения различных заболеваний или расстройств. Также раскрыты фармацевтические композиции, содержащие антитело против С3.

10

Предпосылки создания изобретения

[002] Возрастную дегенерацию желтого пятна (ВДЖП) обычно подразделяют на два основных класса: сухую ВДЖП и влажную ВДЖП. Сухая ВДЖП, также известная как неэкссудативная ВДЖП, характеризуется наличием друз (желтых отложений) в макулярной области. Влажная ВДЖП, также известная как экссудативная ВДЖП или неоваскулярная ВДЖП, характеризуется ростом аномальных кровеносных сосудов из сосудистой оболочки под макулой. Этот процесс также называют хориоидальной неоваскуляризацией, и из новых кровеносных сосудов может просачиваться жидкость, например кровь, в сетчатку и вокруг нее.

15

20

[003] Географическая атрофия (ГА), также известная как атрофическая ВДЖП или развитая сухая ВДЖП, представляет собой запущенную форму ВДЖП, характеризующуюся потерей пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) и фоторецепторов в желтом пятне. Необратимая потеря остроты зрения возникает, когда ГА поражает центральную ямку. Пациенты с более ранними стадиями ГА обычно испытывают дефицит зрительных функций еще до того, как острота зрения ухудшится.

25

30

[004] Основная патофизиология географической атрофии до конца не изучена, однако считают, что способствующим фактором является нарушение регуляции активности комплемента. Несколько продуктов активации комплемента, включая С3а, С5а, С5b-9 и фактор комплемента Н (СФН), показали повышенные уровни в образцах стекловидного тела, мембране Бруха и других частях сосудистой оболочки пациентов с ГА по сравнению с контрольной

группой. Кроме того, при ГА сообщали о снижении уровней ингибиторов комплемента, таких как CD59 (мембраносвязанный ингибитор образования мембраноатакующего комплекса (МАС)) и мембранный кофакторный белок (МСР) (мембраносвязанный регулятор комплемента, обладающий кофакторной активностью для фактора комплемента I (CFI)).

[005] Одной из основных проблем в лечении ГА является то, что наблюдаемое нарушение регуляции активности комплемента происходит в более глубоких слоях сетчатки. В настоящее время не существует подходящих способов лечения ГА, обладающих приемлемой эффективностью, приемлемостью и соблюдением пациентами.

[006] Таким образом, все еще существует неудовлетворенная потребность в новых и улучшенных терапевтических подходах для эффективного лечения заболеваний глаз, таких как географическая атрофия, а также восстановления или предотвращения потери зрения у пациентов, страдающих таким заболеванием.

#### Краткое изложение сущности изобретения

[007] Врожденная иммунная система человека состоит из пути комплемента. Путь комплемента служит для защиты от гноеродной бактериальной инфекции, соединяя врожденный и адаптивный иммунитет; и утилизацию продуктов иммунных комплексов и воспалительного повреждения. Комплемент представляет собой систему из более чем 30 белков, участвующих в каскадных реакциях в плазме и на поверхности клеток. Система комплемента и ее компоненты комплемента участвуют в различных иммунных процессах. Например, комплекс комплемента C5b-9, также называемый терминальным комплексом или мембраноатакующим комплексом (МАС), играет важную роль в гибели клеток, вызывая повреждение проницаемости мембран.

[008] Существует три известных пути активации комплемента: классический, лектиновый и альтернативный. Все три пути приводят к расщеплению C3 конвертазой C3 и последующему расщеплению C5 конвертазой C5 с высвобождением C3a, C3b, C5a и C5b.

[009] Комплемент C3 представляет собой крупный белок, состоящий из 13 различных доменов и имеющий молекулярный размер 185 килодальтон. Во время активации комплемента C3 подвергается протеолитическому расщеплению и структурным модификациям в разных сайтах. Фрагменты,

полученные из C3, выполняют различные эффекторные функции и образуют конвертазы, которые активируют петли амплификации трех путей комплемента. Во избежание сомнений и, если не указано иное, C3, используемый в настоящей заявке относится к человеческому компоненту комплемента 3 UniProt P01024 и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей этот белок. Последовательность человеческого комплемента C3 изображена в SEQ ID NO: 47 и доступна в интернете под номером UniProt P01024.

[0010] C3b происходит от нативного C3 и представляет собой большой из двух элементов, образующихся в результате расщепления C3.

10 [0011] Конвертаза C3 классического пути и лектинового пути, C4bC2a, расщепляет полноразмерный C3 на C3b и анафилатоксин C3a. Альтернативный путь также генерирует C3b и C3a, но использует конвертазу C3 альтернативного пути, C3bBb. Кроме того, в путях комплемента могут образовываться дополнительные продукты деградации C3. Фактор комплемента I (CFI) представляет собой сериновую протеазу плазмы, которая способна навсегда инактивировать C3b до iC3b. Затем iC3b расщепляется на дополнительные фрагменты (C3dg и C3c) с помощью CFI. Дополнительный протеолитический продукт C3, C3d, связывает рецептор комплемента 2 (CR2) и может играть важную роль в контроле клеточного цикла В-клеток. Наряду с белковыми продуктами, производными C3, пути комплемента включают, помимо прочего, C1, C2, C4, C4b, C4a, C5, C5b, C5a, C6, C7, C8, C9, C1q, C1r, C1s, Фактор В, Фактор D, Фактор Р, Фактор Н, Фактор I, CD46 (MCP), CD55 (DAF), CD59 (MAC-IP), CR1 (CD35), CR2 (CD21), CR3, CR4, C3aR, C5aR1, C5aR2, CRIg,  $\alpha$ -цепь C4BP,  $\beta$ -цепь C4BP, фиколин-1, маннозосвязывающий лектин (MBL), MBL-ассоциированная сериновая протеаза-1 (MASP-1) и MBL-ассоциированная сериновая протеаза-2 (MASP-2). Путь комплемента и различные компоненты пути комплемента более подробно описаны в Noris и соавт. *Semin Nephrol.* 2013; 33(6): 479–492.

25 [0012] Недавняя работа продемонстрировала, что компоненты комплемента C3 и C5 являются основными компонентами друз у пациентов с ВДЖП. Предполагают, что их присутствие, а также присутствие мембраноатакующего комплекса (MAC) C5b-9 и других белков-реагентов острой фазы в клетках ПЭС, покрывающих друзы, участвуют в процессе, который может запускать активацию комплемента и образование MAC.

[0013] Было показано, что у больных ГА повышенная и неконтролируемая активация системы комплемента в сосудистой оболочке и сетчатке приводит к разрушению хориокапилляров, повреждению и гибели как клеток РПЭ, так и фоторецепторов. Авторы изобретения выдвинули гипотезу и проиллюстрировали, что нейтрализация С3 в сетчатке блокирует петлю 5 амплификации альтернативного пути комплемента и тем самым снижает образование комплекса, атакующего клеточную токсическую мембрану, и образование провоспалительных компонентов комплемента (С3а, С3b, iС3b, С5а), улучшая клинические результаты пациентов, страдающих ГА.

10 [0014] Однако особенно сложно лечить заболевания глаз, поскольку доставка терапевтических агентов в глаз ограничена из-за нескольких барьеров, включая, помимо прочего, гемато-ретиальные барьеры, такие как ПЭС. Способность проникать через ПЭС и попадать в сосудистую оболочку глаза повысит терапевтический потенциал лекарственных средств.

15 [0015] Для решения этой клинической ситуации авторы изобретения разработали новые антитела и их фрагменты, способные проникать через ПЭС и мембрану Бруха хориоидальной области глаза, тем самым нацеливаясь на комплемент С3 в хориоидальной области. Антитела и их фрагменты в соответствии с настоящим изобретением обладают улучшенными свойствами, 20 позволяющими улучшить клинические исходы у пациентов, страдающих от заболеваний глаз.

[0016] В одном аспекте в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную тяжелую цепь (VH) и переменную легкую цепь (VL),

25 – при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 15, последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и

– при этом VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 30 и 18, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6.

[0017] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

– переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, 22 или 24; и

5       – переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, 23 или 25.

[0018] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении  
10 предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

– переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 %  
15 идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, 22 или 24; и

– переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 %  
идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, 23 или 25;

20       при этом:

– VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 15, последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и

– VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4,  
25 последовательность CDR-L2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 18, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6.

[0019] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

30       – переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20; и

– переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21;

5 при этом:

– VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 2, и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и

10 – VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 5, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6.

[0020] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

15 – переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22; и

20 – переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23;

при этом:

25 – VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 15, и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 5, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6.

30 [0021] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

– переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по

меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24; и

- переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25;

при этом:

- VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 15, и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 18, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6.

[0022] В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие: переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20, 22 или 24; и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, 23 или 25.

[0023] В дополнительном варианте осуществления изобретение обеспечивает антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

- а. переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21, соответственно;
- б. переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23, соответственно; или
- в. переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25, соответственно.

[0024] В одном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением выбирают из группы, включающей в себя одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент Fv, диатело, малый миметик антитела.



[0025] В одном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий или включающий в себя переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, которые связаны полипептидным линкером. scFv от N- до C-конца может содержать или состоять из переменной легкой цепи, линкера и переменной тяжелой цепи. scFv от N- до C-конца может содержать или состоять из переменной тяжелой цепи, линкера и переменной легкой цепи. Линкер может содержать полипептид, выбранный из SEQ ID NOs: 43-46 и 56-65, предпочтительно SEQ ID NO: 46.

[0026] В альтернативном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент выбирают из групп, состоящих из однодоменного антитела, такого как sdAb, sdFv, нанотело, V-Nar и VHH. В этом конкретном варианте осуществления указанное антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную тяжелую цепь. В одном варианте осуществления указанная переменная тяжелая цепь содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 15, последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3. В другом варианте осуществления указанная переменная тяжелая цепь содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20, 22 или 24.

[0027] В одном варианте осуществления указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), более предпочтительно гуманизированный scFv.

[0028] В дополнительном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент, содержащий полипептид, имеющий по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % идентичности с последовательностью, выбранной из группы, включающей в себя SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30 и 31.

[0029] В дополнительном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент, включающий в себя одну

последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30 и 31.

5 [0030] В дополнительном варианте осуществления антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент, состоящий из одной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30 и 31.

10 [0031] В одном варианте осуществления антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением способны ингибировать пути активации комплемента, включая классический путь (CP), лектиновый путь (LP) и альтернативный путь (AP). В некоторых вариантах осуществления антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением способны примерно эквивалентно ингибировать активность путей комплемента CP, LP и AP. Например, но никоим образом не ограничиваясь, антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент 15 способны ингибировать активность пути CP по меньшей мере на 80 %, способны ингибировать активность LP по меньшей мере на 80 %, и способны ингибировать активность AP по меньшей мере на 80 %. В некоторых вариантах осуществления ингибирование активности путей комплемента CP, LP и AP 20 составляет по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере приблизительно 90 %, или по меньшей мере приблизительно 95 %.

[0032] В одном варианте осуществления антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением способны связывать комплемент C3 и C3b.

25 [0033] В одном варианте осуществления антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением способны предотвращать образование конвертазы C3.

[0034] В одном варианте осуществления антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением способны 30 проникать через мембрану Бруха.

[0035] В конкретном варианте осуществления антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением связывается с человеческим C3 при  $K_D < 50$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 15$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 10$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 7$  нМ,

предпочтительно при  $K_D < 1$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,5$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,2$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,15$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,10$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,05$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,04$  нМ, более предпочтительно при  $K_D < 0,03$  нМ.

5 [0036] В другом варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением связывается с человеческим С3b при  $K_D < 50$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 15$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 10$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 7$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 1$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,5$  нМ, 10 предпочтительно при  $K_D < 0,2$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,15$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,10$  нМ, более предпочтительно при  $K_D < 0,05$  нМ.

[0037] В одном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением имеет примерно эквивалентное сродство связывания с С3 и С3b.

15 [0038] В одном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением имеет сродство связывания с С3a, iС3b, С4, С4b, С5, и/или С5b приблизительно  $10^{-4}$  М или менее (т.е., слабее).

[0039] В дополнительном варианте осуществления антитело против С3 или 20 его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением имеет более слабое сродство связывания с С3a, iС3b, С4, С4b, С5, и/или С5b по сравнению со сродством связывания с С3 и С3b.

[0040] В конкретном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением не имеет 25 средства связывания с С3a, iС3b, С4, С4b, С5, и/или С5b. В настоящей заявке термин «отсутствие сродства связывания» относится к отсутствию обнаруживаемого сродства связывания относительно фона с помощью одного или нескольких анализов сродства связывания, известных в данной области, таких как, помимо прочего, анализ ELISA.

30 [0041] В некоторых вариантах осуществления антитело в соответствии с изобретением способно связывать комплемент С3 таким образом, чтобы предотвратить образование конвертазы С3. В конкретном варианте осуществления антитело в соответствии с изобретением ингибирует активность

конвертазы С3. В конкретном варианте осуществления антитело в соответствии с изобретением способно ингибировать петлю амплификации конвертазы С3.

5 [0042] В одном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением способны ингибировать активность хориоидального С3.

10 [0043] Ожидается, что в некоторых вариантах осуществления антитело против С3 в соответствии с изобретением будет иметь более высокую эффективность и безопасность при лечении ГА или другого заболевания глаз по сравнению с другими видами терапии благодаря следующим свойствам, изложенным ниже.

[0044] В предпочтительном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением способны связывать эпитоп комплемента С3, при этом такое связывание предотвращает образование конвертазы С3.

15 [0045] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с по меньшей мере одним аминокислотным остатком внутри аминокислотных областей, как указано в SEQ ID NO: 47. В предпочтительном варианте осуществления в настоящем изобретении  
20 предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает аминокислотные области, как указано в SEQ ID NO: 48.

25 [0046] В одном аспекте изобретение обеспечивает антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается по меньшей мере с одним аминокислотным остатком в пределах остатков от аминокислоты 366 до аминокислоты 478 человеческого комплемента С3, как указано в SEQ ID NO: 47.

30 [0047] В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается по меньшей мере с одним аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящей из остатков 366, 392-396, 413-421, 425, 427, 442, 453 и 478 человеческого комплемента С3, как указано в SEQ ID NO: 47.

[0048] В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается со всеми аминокислотными остатками 366, 392-396, 413-421, 425, 427, 442, 453 и 478 человеческого комплемента С3, как указано в SEQ ID NO: 47.

[0049] В одном аспекте в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в качестве лекарственного средства.

5 [0050] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения при лечении или профилактике заболеваний сетчатки или глаз. Предпочтительно указанное заболевание сетчатки или глаз является заболеванием или расстройством, опосредованным комплементом С3. Более  
10 предпочтительно указанное заболевание относится к любому расстройству, при котором возникновение, прогрессирование или сохранение симптомов или заболевания требует участия С3.

[0051] В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения одного или нескольких заболеваний сетчатки или глаз, включающему в себя введение фармацевтически эффективного количества  
15 антитела или антигенсвязывающего фрагмента пациенту, нуждающемуся в этом.

[0052] В одном аспекте в настоящем изобретении предложено применение указанного антитела против С3 или указанного его антигенсвязывающего фрагмента для изготовления лекарственного средства для лечения или профилактики заболеваний глаз.

20 [0053] В одном аспекте в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения при лечении или предупреждения заболевания, выбранного из группы, которая включает в себя ретинопатию, пролиферативную ретинопатию (ПР), такую как ретинопатия недоношенных, ишемическую ретинопатию, диабетическую ретинопатию (ДР),  
25 включая пролиферативную диабетическую ретинопатию (ПДР) и непролиферативную диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек (ДМО), диабетическую макулярную ишемию (ДМИ), возрастную дегенерацию жёлтого пятна (ВДЖП), включая сухую ВДЖП и влажную ВДЖП, географическую атрофию (ГА), пигментный ретинит, наследственную  
30 дистрофию сетчатки, миопическую дегенерацию, окклюзию вен сетчатки, окклюзию артерий сетчатки, эндофтальмит, увеит, кистозный макулярный отек, хориоидальную неоваскулярную мембрану, вторичную по отношению к каким-либо заболеваниям сетчатки, невротии зрительного нерва, глаукому, отслойку сетчатки, токсическую ретинопатию, радиационную ретинопатию,

травматическую ретинопатию, лекарственную васкулопатию сетчатки, неоваскуляризацию сетчатки, полипoidную хориоидальную васкулопатию, васкулит сетчатки, микроаневризму сетчатки, ретролентальную фиброплазию, хориоретинит, дистрофию Фукса, макулярную телеангиэктазию, синдром  
5 Ашера, пароксизмальную ночную гемоглобинурию (ПНГ) и болезнь Штаргардта.

[0054] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения при лечении или предупреждения заболевания, выбранного из  
10 группы, включающей в себя возрастную дегенерацию желтого пятна, географическую атрофию, неоваскулярную глаукому и диабетическую ретинопатию. В еще одном предпочтительном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения при лечении или  
15 предупреждении географической атрофии.

[0055] В одном аспекте антитело в соответствии с изобретением ингибирует активность классического пути комплемента (СР), лектинового пути (LP) и альтернативного пути (AP). Таким образом, в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент для  
20 применения в способе лечения заболеваний глаз путем ингибирования активности классического пути комплемента (СР), лектинового пути (LP) и альтернативного пути (AP). Настоящее изобретение также обеспечивает антигенсвязывающий белок или его фрагмент, как описано выше, для применения в способе лечения заболевания или расстройства, опосредованного  
25 комплементом С3, путем ингибирования активности локализованного в хориоиде комплемента С3.

[0056] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ диагностики нарушений, связанных с комплементом С3, в биологическом образце с использованием антитела против С3 или его  
30 антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением.

[0057] В одном аспекте в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель.

[0058] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция, содержащая антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят парентеральным путем, внутривенным путем, интравитреальным (IVT) путем или подкожным путем введения, предпочтительно интравитреальным путем.

[0059] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая полинуклеотид или полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0060] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующие антитело или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением.

[0061] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащие:

– последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 24, и/или

– последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 25.

[0062] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую scFv, представленную в SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, или SEQ ID NO: 31.

[0063] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен вектор экспрессии, содержащий выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащие последовательность, кодирующую последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, или SEQ ID NO: 24, и/или последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 25.

[0064] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено вектор экспрессии, содержащий выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую последовательность, кодирующую scFv, представленную в SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, или SEQ ID NO: 31.

[0065] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен вирусный вектор, содержащий выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащие последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, или SEQ ID NO: 24, и/или последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 25.

[0066] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено вирусный вектор, содержащий выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую scFv, представленную в SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, или SEQ ID NO: 31.

[0067] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложена клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии или выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащие последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, или SEQ ID NO: 24, и/или последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 25.

[0068] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложена клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии или выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую scFv, представленную в SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, или SEQ ID NO: 31.

[0069] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ получения антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий в себя получение клетки-хозяина, содержащей вектор экспрессии или выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, содержащие последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи, как



указано в SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, или SEQ ID NO: 24, и/или последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 25; и культивирование клетки-хозяина.

5 [0070] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ получения антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий в себя получение клетки-хозяина, содержащей вектор экспрессии или выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую scFv, представленную в SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID  
10 NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, или SEQ ID NO: 31.

[0071] В одном варианте осуществления способ получения антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента дополнительно включает выделение и очистку антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента.

15 Краткое описание чертежей

[0072] Фигура 1: Лучшее проникновение в сетчатку с scFv после эквимольной IVT инъекции у яванского макака. На фигуре 1А показан уровень воздействия на сетчатку интравитреальной инъекции scFv (40 нмоль scFv, бролюцизумаб, 1 мг). Данные адаптированы из бролюцизумаба BLA. На фигуре  
20 1В показан уровень воздействия на сетчатку интравитреальной инъекции Fab (40 нмоль Fab, ранибизумаб, 2 мг). Данные адаптированы из: Invest Ophthalmol Vis Sci. февраль 2005; 46(2):726-33.

[0073] Фигура 2: На этой фигуре показано связывание клона I с человеческим компонентом С3. На фигуре 2А показана SEQ ID NO: 55, которая является частью последовательности С3, как указано в SEQ ID NO: 47, в которой  
25 остатки эпитопа выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. На фигуре 2В показана EM-структура комплекса С3с: Клон I, в которой структура С3с изображена серым цветом, а структура scFv - черной лентой соответственно. Окончательная карта EM показана как полупрозрачная поверхность на уровне  
30 контура 0,214.

[0074] Фигура 3: На этой фигуре показана диффузия in vitro клона I и сравнительного соединения А2 через мембрану Бруха свиньи. Диффузию измеряли в течение 72 часов в камере Уссинга, и количество соединения, диффундировавшего через мембрану Бруха, выражали как количество

соединения, измеренное в камере диффузата, по сравнению с общим количеством соединения (образец и камера диффузата). Общее количество соединения было установлено равным 100 %.

5 [0075] Фигура 4: На этой фигуре показана диффузия *in vitro* сравнительного соединения АЗ и сравнительного соединения А2 через мембрану Бруха свиньи. Диффузию измеряли в течение 72 часов в камере Уссинга, и количество соединения, диффундировавшего через мембрану Бруха, выражали как количество соединения, измеренное в камере диффузата, по сравнению с  
10 общим количеством соединения (образец и камера диффузата). Общее количество соединения было установлено равным 100 %.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

##### [0076] Определения

[0077] Обобщенная структура антител или иммуноглобулина хорошо известна специалистам в данной области техники, эти молекулы представляют  
15 собой гетеротетрамерные гликопротеины, как правило, примерно 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь ковалентно связана с тяжелой цепью одной дисульфидной связью с образованием гетеродимера, а гетеротетрамерная молекула образуется за счет ковалентной дисульфидной связи между двумя  
20 идентичными тяжелыми цепями гетеродимеров. Хотя легкая и тяжелая цепи связаны вместе одной дисульфидной связью, количество дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями варьируется в зависимости от изоформа иммуноглобулина. Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет равномерно распределенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая  
25 цепь имеет на амино-конце переменный домен ( $V_H$  = переменная тяжелая цепь), за которым следуют три или четыре константных домена ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ , и  $C_{H4}$ ), а также шарнирную область между  $C_{H1}$  и  $C_{H2}$ . Каждая легкая цепь имеет два домена, аминоконцевой переменный домен ( $V_L$  = переменная легкая цепь) и а карбоксиконцевой константный домен ( $C_L$ ). Домен  $V_L$  нековалентно  
30 связывается с доменом  $V_H$ , тогда как домен  $C_L$  обычно ковалентно связан с доменом  $C_{H1}$  через дисульфидную связь. Считается, что определенные аминокислотные остатки образуют поверхность раздела между переменными доменами легкой и тяжелой цепей (Chothia и соавт., 1985, J. Mol. Biol. 186:651-663.)

[0078] Некоторые участки в переменных доменах сильно различаются между разными антителами, т.е. являются «гипервариабельными». Эти гипервариабельные участки содержат остатки, которые непосредственно участвуют в связывании и специфичности каждого конкретного антитела в отношении его специфической антигенной детерминанты. Гипервариабельность как в переменных доменах легкой цепи, так и в переменных доменах тяжелой цепи сосредоточена в трех сегментах, известных как определяющие комплементарности области (CDR) или гипервариабельные петли (HVL). CDR определены путем сравнения последовательностей в Kabat и соавт., 1991, In: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>е</sup> изд. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., тогда как HVL структурно определены в соответствии с трехмерной структурой переменного домена, как описано у Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917.

[0079] Точные границы аминокислотных последовательностей данной CDR или FR могут быть дополнительно определены с использованием дополнительной номенклатуры, такой как схема нумерации АНо, как описано у Honegger A and Pluckthun A, «Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool» J Mol Biol, 8 июня 2001; 309(3):657-70, или схема нумерации «IMGT»), как описано в Lefranc M P и соавт., «IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains и Ig superfamily V-like domains,» Dev Comp Immunol, 2003 г., январь; 27 (1):55-77.

[0080] Три CDR в каждой из тяжелой и легкой цепей разделены каркасными областями (FR), которые содержат последовательности, имеющие тенденцию быть менее переменными. От амино-конца до карбокси-конца переменных доменов тяжелой и легкой цепей FR и CDR расположены в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Главным образом β-складчатая конфигурация FR сближает CDR в каждой из цепей друг с другом, а также с CDR из другой цепи. Полученная конформация вносит вклад в сайт связывания антигена (см. Kabat и соавт., 1991, NIH Publ. № 91-3242, том I, сс. 647-669), хотя не все остатки CDR обязательно принимают непосредственное участие в связывании антигена.

[0081] Остатки FR и константные домены Ig не участвуют напрямую в связывании антигена, но способствуют связыванию антигена и/или опосредуют

эффекторную функцию антитела. Считается, что некоторые остатки FR оказывают существенное влияние на связывание антигена по меньшей мере тремя способами: нековалентным связыванием непосредственно с эпитопом, взаимодействием с одним или несколькими остатками CDR и воздействием на поверхность раздела между тяжелой и легкой цепями. Константные домены не участвуют напрямую в связывании антигена, но опосредуют различные эффе-  
5  
кторные функции Ig, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), комплементзависимой цитотоксичности (CDC) и антителозависимом клеточном фагоцитозе (ADCP).

10 [0082] Легкие цепи иммуноглобулинов позвоночных относятся к одному из двух четко различающихся классов, каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ), на основе аминокислотной последовательности константного домена. Для сравнения, тяжелые цепи иммуноглобулинов млекопитающих отнесены к одному из пяти основных классов в соответствии с последовательностью константных доменов:  
15 IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgG и IgA далее подразделены на подклассы (изотипы), например, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> и IgA<sub>2</sub>. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ , соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации классов нативных иммуноглобулинов хорошо известны.

20 [0083] Термины «антитело», «антитело против С3», «гуманизированное антитело против С3» и «вариант гуманизированного антитела против С3» используют в настоящей заявке в самом широком смысле и конкретно охватывают моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, такие как  
25  
вариабельные домены и другие части антител, которые проявляют желаемую биологическую активность, например, связывание с С3.

[0084] Понятие «моноклональное антитело» (mAb) относится к антителу из популяции, по существу, гомогенных антител; то есть отдельные антитела в  
30  
этой популяции идентичны, за исключением встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела высокоспецифичны, они направлены против одной антигенной детерминанты, «эпитопа». Следовательно, модификатор «моноклональный» указывает на, по существу, гомогенную популяцию антител, направленных на

идентичный эпитоп, и не может быть истолкован как требующий получения антитела каким-либо конкретным методом. Следует понимать, что моноклональные антитела могут быть получены любым методом или методом, известным в данной области; включая, например, метод гибридом (Kohler и соавт., 1975, Nature 256:495), или методы рекомбинантной ДНК, известные в данной области (см., например, Патент США № 4,816,567), или способы выделения моноклональных рекомбинантно полученных с использованием библиотеки фаговых антител с использованием методик, описанных у Clackson и соавт., 1991, Nature 352: 624-628, и Marks и соавт., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-597.

[0085] Химерные антитела состоят из переменных областей тяжелой и легкой цепей антитела одного вида (например, не относящегося к человеку млекопитающего, такого как мышь) и константных областей тяжелой и легкой цепи антитела другого вида (например, человека) и могут быть полученные путем связывания последовательностей ДНК, кодирующих переменные области антитела первого вида (например, мыши) с последовательностями ДНК для константных областей антитела второго вида (например, человека) и трансформации хозяина экспрессионным вектором, содержащим связанные последовательности, позволяющие продуцировать химерное антитело. Альтернативно, химерное антитело также может представлять собой антитело, в котором одна или несколько областей или доменов тяжелой и/или легкой цепи идентичны, гомологичны или являются вариантом соответствующей последовательности в моноклональном антителе из другого класса или изотипа иммуноглобулинов, или из консенсусной последовательности или последовательности зародышевой линии. Химерные антитела могут включать фрагменты таких антител при условии, что фрагмент антитела проявляет желаемую биологическую активность своего родительского антитела, например, связывание с тем же эпитопом (см., например, патент США № 4,816,567; и Morrison и соавт., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855).

[0086] Термины «фрагмент антитела», «антигенсвязывающий фрагмент», «фрагмент антитела против С3», «фрагмент гуманизированного антитела против С3», «вариантный фрагмент гуманизированного антитела против С3» относятся к части полноразмерного антитела против С3, в котором сохраняется переменная область или функциональная способность, например,

специфическое связывание эпитопа СЗ. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагмент Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, scFv и scFv-Fc, диатело, линейное антитело, одноцепочечное антитело, минитело, диатело, образованное из фрагментов антител, фрагменты однодоменных антител (например, sdAb, sdFv, нанотела, VHH) и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[0087] Полноразмерные антитела можно обрабатывать ферментами, такими как папаин или пепсин, для получения пригодных фрагментов антител. Расщепление папаином применяют для получения двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов антител, называемых фрагментами «Fab», каждый с одним антигенсвязывающим сайтом и остаточным фрагментом «Fc». Фрагмент Fab также содержит константный домен легкой цепи и домен C<sub>H1</sub> тяжелой цепи. Обработка пепсином дает фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, который имеет два антигенсвязывающих сайта и все еще способен перекрестно связывать антиген.

[0088] Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab наличием дополнительных остатков, включая один или несколько цистеинов из шарнирной области антитела на С-конце домена C<sub>H1</sub>. Фрагменты F(ab')<sub>2</sub> антител представляют собой пары фрагментов Fab', связанных остатками цистеина в шарнирной области. Также известны другие химические соединения фрагментов антител.

[0089] Фрагмент «Fv» содержит полный сайт распознавания и связывания антигена, состоящий из димера одного переменного домена тяжелой и одного легкой цепей в тесной нековалентной связи. В этой конфигурации три CDR каждого переменного домена взаимодействуют, определяя сайт связывания антигена на поверхности димера V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>. В совокупности шесть CDR придают антителу антигенсвязывающую специфичность.

[0090] Фрагмент «одноцепочечного Fv» или «scFv» фрагмент антитела представляет собой одноцепочечный вариант Fv, содержащий домены V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> антитела, где домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Одноцепочечный Fv способен распознавать и связывать антиген. Полипептид scFv может также необязательно содержать полипептидный линкер, расположенный между доменами V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, чтобы облегчить формирование желаемой трехмерной структуры для связывания антигена с помощью scFv (см., например, Pluckthun, 1994, в: The Pharmacology of monoclonal Antibodies, том

113, изд. Rosenberg and Moore, Springer-Verlag, New York, сс. 269-315). Такие линкеры включают в себя, помимо прочего, повторяющиеся аминокислотные последовательности (SEQ ID NO: 43) или их варианты. Такие молекулы scFv могут иметь общую структуру: NH<sub>2</sub>-VL-линкер-VH-COOH или NH<sub>2</sub>-VH-линкер-VL-COOH. scFv обычно не содержит областей константного домена антитела, хотя scFv в соответствии с изобретением может быть связан или присоединен к областям константного домена антитела (например, Fc домену антитела) для изменения различных свойств scFv, включая, помимо прочего, увеличение периода полувыведения из сыворотки или ткани. scFv обычно имеет молекулярную массу приблизительно 25 кДа и гидродинамический радиус приблизительно 2,5 нМ.

[0091] В одном варианте осуществления антитела и фрагменты антител по настоящему изобретению представляют собой одноцепочечные антитела (scFv) или фрагменты Fab. В случае антител scFv выбранный домен VL может быть связан с выбранным доменом VH в любой ориентации с помощью гибкого линкера. Гибкие линкеры, как предусмотрено в настоящей заявке, представляют собой пептидные или полипептидные линкеры длиной по меньшей мере 1 аминокислоту. Предпочтительно линкеры имеют длину от 1 до 100 аминокислот. Более предпочтительно линкеры имеют длину от 5 до 50 аминокислот, более предпочтительно от 10 до 40 аминокислот и еще более предпочтительно линкеры имеют длину от 15 до 30 аминокислот. Неограничивающие примеры часто используемых малых линкеров включают последовательности аминокислот глицина и серина, называемые мини-линкером GS. Предпочтительными примерами линкерных последовательностей являются линкеры Gly/Ser различной длины, такие как линкеры (gly<sub>x</sub>ser<sub>y</sub>)<sub>z</sub>, включая (gly<sub>4</sub>ser)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 45), (gly<sub>4</sub>ser)<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 46), (gly<sub>4</sub>ser) (SEQ ID NO: 44), (gly<sub>3</sub>ser) (SEQ ID NO: 56), gly<sub>3</sub>, и (gly<sub>3</sub>ser<sub>2</sub>)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 65). Количество аминокислот в этих линкерах может варьироваться, например, их может быть 4 (например, GGGS) (SEQ ID NO: 56), 6 (например, GGSGGS) (SEQ ID NO: 57), 7 (например, GGGS<sub>2</sub>GS) (SEQ ID NO: 58) или кратно им, например, два, три или более повторов этих четырех, шести или семи аминокислот. В одном варианте осуществления антитело в соответствии с изобретением содержит линкер, выбранный из группы, включающей в себя последовательности, представленные в SEQ ID NO: 43 (GGGGS), SEQ ID NO: 44 (GGGGSGGGGS), SEQ ID NO: 45

(GGGGSGGGGSGGGGS) и SEQ ID NO: 46 (GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS). В конкретном варианте осуществления указанный линкер представляет собой SEQ ID NO: 46. Указанный линкер также может представлять собой вариант, описанный в Holliger и соавт. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448.

5 Другие линкеры, которые можно использовать для настоящего изобретения, описаны у Alfthan и соавт. (1995), Protein Eng. 8:725-731, Choi и соавт. (2001), Eur. J. Immunol. 31:94-106, Hu и соавт. (1996), Cancer Res. 56:3055-3061, Kipriyanov и соавт. (1999), J. Mol. Biol. 293:41-56 and Roovers и соавт. (2001), Cancer Immunol. Immunother. 50:51-59. Дополнительные примеры линкеров  
10 включают следующие: линкер 7GS: SGGSGGS (SEQ ID NO: 59); линкер 8GS: линкер 9GS: GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 60); линкер 18GS: GGGGSGGGGSGGGGGGGGS (SEQ ID NO: 61); линкер 25GS: GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 62); линкер 30GS: GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 63); и линкер 35GS:  
15 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 64).

[0092] В scFv в соответствии с настоящим изобретением расположение VL и VH может быть либо VL-линкер-VH, либо VH-линкер-VL, причем первая ориентация является предпочтительной. Однако также предполагаются антитела с одним доменом VH или VL. В случае Fab-фрагментов выбранные  
20 переменные домены VL легкой цепи слиты с константной областью каппа-цепи человеческого Ig, тогда как подходящие переменные домены VH тяжелой цепи слиты с первым (N-концевым) константным доменом CH1 человеческого IgG. На C-конце константного домена или в других сайтах переменного или константного домена может образовываться межцепочечный дисульфидный  
25 мостик.

[0093] Используемые в настоящей заявке понятия «VHH», «нанотело» или «антитело, состоящее только из тяжелых цепей» представляет собой антигенсвязывающий белок, содержащий один переменный домен тяжелой цепи, полученный из видов семейства Camelidae, которые включают верблюдов,  
30 лам, альпака. VHH обычно имеет молекулярную массу около 15 кДа.

[0094] Другие известные фрагменты антител включают те, которые содержат пару tandemных сегментов Fd (V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>-V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>) с образованием пары антигенсвязывающих областей. Эти «линейные антитела» могут быть



биспецифическими или моноспецифическими, как описано, например, в Zarata и соавт. 1995, Protein Eng. 8(10):1057-1062.

[0095] Гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела представляет собой конкретный тип химерного антитела, которое  
5 включает вариант аминокислотной последовательности иммуноглобулина или его фрагмент, который способен связываться с заранее определенным антигеном и который включает один или несколько FR, имеющих, по существу, аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина и одну или несколько CDR, имеющих, по существу, аминокислотную  
10 последовательность нечеловеческого иммуноглобулина. Эта нечеловеческая аминокислотная последовательность, которую часто называют «импортной» последовательностью, обычно берется из «импортного» домена антитела, в частности варибельного домена. В общем, гуманизированное антитело включает по меньшей мере CDR или HVL нечеловеческого антитела,  
15 вставленные между FR варибельного домена тяжелой или легкой цепи человека.

[0096] В настоящем изобретении описаны специфические гуманизированные антитела против С3, которые содержат CDR, полученные из  
20 мышинового, кроличьего, ламы или химерного антитела, встроенные между FR варибельных доменов тяжелой и легкой цепей зародышевой линии человека. Следует понимать, что определенные остатки FR, не относящиеся к человеку (например, из мышинных, кроличьих, ламы или химерных антител и т.д.), могут быть важны для функции гуманизированных антител и, поэтому некоторые  
25 остатки варибельных доменов тяжелой и легкой цепи последовательности зародышевой линии человека модифицируют так, чтобы они были такими же, как и в соответствующей нечеловеческой последовательности.

[0097] Используемые в настоящей заявке выражения «антитело в соответствии с изобретением» и «антитело против С3 в соответствии с изобретением» относятся к антителу, направленному против С3, или его  
30 антигенсвязывающему фрагменту, описанному в настоящей заявке. В одном варианте осуществления указанное антитело в соответствии с изобретением представляет собой scFv. В конкретном варианте осуществления антитело в соответствии с изобретением содержит варибельную тяжелую цепь (VH), и варибельную легкую цепь (VL), при этом VH содержит последовательность

CDR-H1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 15, последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и при этом VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 18, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6.

[0098] В одном варианте осуществления изобретение относится к гуманизованному антителу против С3 или его фрагменту. Гуманизированные антитела содержат, по существу, по меньшей мере один, а обычно два переменных домена (таких как содержатся, например, во фрагментах Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fab<sub>с</sub> и F<sub>v</sub>) в которых все или практически все из CDR соответствуют CDR нечеловеческого иммуноглобулина, и, в частности, в настоящей заявке, CDR имеют кроличье происхождение, а FR представляют собой консенсусную последовательность иммуноглобулина человека или последовательность зародышевой линии. В другом аспекте гуманизованное антитело против С3 также включает по меньшей мере часть F<sub>с</sub>-области иммуноглобулина, обычно иммуноглобулина человека. Обычно антитело содержит как легкую цепь, так и по меньшей мере переменный домен тяжелой цепи. Антитело также может включать одну или несколько областей тяжелой цепи C<sub>H1</sub>, шарнира, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub> и/или C<sub>H4</sub>, в зависимости от ситуации.

[0099] Гуманизованное антитело против С3 может быть выбрано из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, включая IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> и IgA<sub>2</sub>. Например, константный домен может быть константным доменом связывания комплемента, если желательно, чтобы гуманизованное антитело проявляло цитотоксическую активность, и изотипом обычно является IgG<sub>1</sub>. Если такая цитотоксическая активность нежелательна, то константный домен может быть другого изотипа, например, IgG<sub>2</sub> или представлять собой модифицированную последовательность IgG<sub>1</sub>, лишенную цитотоксической активности, например, содержащую мутацию N297A или L234A вместе с L235A. Альтернативное гуманизованное антитело против С3 может содержать последовательности более чем одного класса или изотипа иммуноглобулина, и выбор конкретных константных доменов для оптимизации желаемых эффекторных функций находится в компетенции обычного специалиста в данной области. В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителам, которые

представляют собой антитела IgG1 и, более конкретно, антитела IgG1, характеризующиеся сниженной эффекторной функцией.

[00100] FR и CDR или HVL гуманизованного антитела против С3 или его фрагментов, включая scFv, не обязательно должны точно соответствовать родительским последовательностям. Например, один или несколько остатков в импортруемой CDR или HVL, или консенсусной последовательности, или последовательности FR зародышевой линии могут быть изменены (например, мутагенизированы) путем замены, вставки или делеции, так что полученный аминокислотный остаток больше не идентичен исходному остатку в соответствующем положении в любой родительской последовательности, но, тем не менее, антитело сохраняет функцию связывания с С3. Такое изменение обычно не будет обширным и будет консервативным. Обычно по меньшей мере 75 % остатков гуманизованных антител будут соответствовать остаткам родительской консенсусной последовательности или последовательности FR зародышевой линии и импортруемых последовательностей CDR, чаще по меньшей мере 90 %, а наиболее часто больше 95 %, или более 98 % или более 99 %.

[00101] Термины «консенсусная последовательность» и «консенсусное антитело» относятся к аминокислотной последовательности, которая включает наиболее часто встречающийся аминокислотный остаток в каждом месте во всех иммуноглобулинах любого конкретного класса, изотипа или структуры субъединицы, например, варибельного домена иммуноглобулина человека. Консенсусная последовательность может быть основана на иммуноглобулинах определенного вида или многих видов. Под «консенсусной» последовательностью, структурой или антителом понимают консенсусную последовательность человека, как описано в определенных вариантах осуществления, и для обозначения аминокислотной последовательности, которая включает наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в каждом месте во всех иммуноглобулинах человека любого конкретного класса, изотипа или структуры субъединицы. Таким образом, консенсусная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую в каждом положении аминокислоту, которая присутствует в одном или нескольких известных иммуноглобулинах, но которая не может точно дублировать всю аминокислотную последовательность любого отдельного иммуноглобулина.

Консенсусную последовательность вариабельной области не получают из  
любого природного антитела или иммуноглобулина. Kabat и соавт., 1991,  
Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд. Public Health Service,  
National Institutes of Health, Bethesda, Md., и их варианты. FR консенсусных  
5 последовательностей тяжелой и легкой цепей и их вариантов обеспечивают  
полезные последовательности для получения гуманизированных антител против  
СЗ. См., например, патенты США 6,037,454 и 6,054,297.

[00102] Последовательности зародышевой линии человека естественным  
образом встречаются в человеческой популяции. Последовательности  
10 зародышевой линии человека соответствуют молекулам белков антител,  
кодируемым сегментами генов вариабельности (V), разнообразия (D) и  
соединения (J), которые перестраиваются и образуют рекомбинированные гены.  
Рекомбинация VDJ приводит к образованию большого, но в конечном итоге  
конечного числа немутированных белков антител, известных как репертуар  
15 зародышевой линии. Комбинация этих генов зародышевой линии создает  
разнообразие антител. Последовательности антител зародышевой линии для  
легкой цепи антитела происходят из консервативных v-генов и j-генов  
зародышевой линии каппа или лямбда человека. Подобным образом  
последовательности тяжелых цепей происходят из v-, d- и j-генов зародышевой  
20 линии (LeFranc, M-P, и LeFranc, G, «The Immunoglobulin Facts Book» Academic  
Press, 2001).

[00103] «Выделенное» антитело представляет собой антитело, которое было  
идентифицировано, выделено и/или восстановлено из компонента его  
естественного окружения. Загрязняющими компонентами естественного  
25 окружения антитела являются те материалы, которые могут мешать  
диагностическому или терапевтическому использованию антитела, и это могут  
быть ферменты, гормоны или другие белковые или небелковые растворенные  
вещества. В одном аспекте антитело будет очищено до выделения по меньшей  
мере более 95 % по массе антитела.

30 [00104] Термин «эффективность антитела» относится к  
факторам/свойствам, которые способствуют распознаванию антигена антителом  
или эффективности антитела *in vivo*. В предпочтительном варианте  
осуществления это относится к способности антитела предотвращать коллапс  
цитоскелета в клетках сетчатки. Изменения в аминокислотной

последовательности антитела могут влиять на свойства антитела, такие как сворачивание, и могут влиять на физические факторы, такие как начальная скорость связывания антитела с антигеном ( $k_a$ ), константа диссоциации антитела от антигена ( $k_d$ ), константа сродства антитела к антигену ( $K_d$ ), конформация антитела, стабильность белка и период полураспада антитела. В настоящей заявке термин «сродство» относится к силе взаимодействия между антигенсвязывающим сайтом антитела и эпитопом, с которым оно связывается. Как легко понятно специалистам в данной области, сродство антитела или антигенсвязывающего белка может быть указана как константа диссоциации ( $K_D$ ) в молярном отношении ( $M$ ). Способность антигенсвязывающего домена связываться со специфической антигенной детерминантой может быть измерена или с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), или с помощью других методов, известных специалисту в данной области, например, метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (анализировали на приборе VIAcore), например, проводили при 25°C (Liljeblad и соавт., Glyco J 17, 323-329 (2000)), и традиционные анализы связывания (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)).

[00105] Используемые в настоящей заявке термины «идентичный» или «процент идентичности» в контексте двух или большего количества последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов, относятся к двум или большему количеству последовательностей или подпоследовательностей, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент нуклеотидов или аминокислотные остатки, которые одинаковы при сравнении и выровнены для максимального соответствия. Чтобы определить процент идентичности, последовательности выравнивают для оптимальных целей сравнения (например, пробелы могут быть введены в последовательность первой аминокислоты или последовательность нуклеиновой кислоты для оптимального выравнивания со второй последовательностью аминокислоты или нуклеиновой кислоты). Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих аминокислотных положениях или нуклеотидных положениях. Когда положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы в этом положении идентичны. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений,

разделенных последовательностями (то есть % идентичности = # идентичных положений/общее # положений (например, перекрывающихся положений) x100). В некоторых вариантах осуществления две сравниваемые последовательности имеют одинаковую длину после того, как в последовательности введены пробелы, в зависимости от случая (например, за исключением дополнительной последовательности, выходящей за пределы сравниваемых последовательностей). Например, когда сравнивают последовательности переменной области, то лидерные и/или последовательности константной области не учитывают. Для сравнений последовательностей между двумя последовательностями «соответствующая» CDR относится к CDR в одном и том же месте в обеих последовательностях (например, CDR-H1 каждой последовательности).

[00106] Определение процента идентичности или процента сходства между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма. Предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, измененный, как в Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST Altschul и соавт., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. Поиск нуклеотидов BLAST может быть осуществлен с помощью программы NBLAST, оценка = 100, длина слова = 12 для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных нуклеиновой кислоте, кодирующей интересующий белок. Поиск белка BLAST может быть осуществлен с помощью программы XBLAST, оценка = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных интересующему белку. Для получения выравниваний с пробелом для сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul и соавт., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. В качестве альтернативы PSI-Blast может быть использован для осуществления итеративного поиска, который обнаруживает отдаленные отношения между молекулами (Id.). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast, могут быть использованы параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). Другим предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма,

используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Майерса и Миллера, CABIOS (1989). Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программного обеспечения для выравнивания последовательности GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать таблицу веса остатков PAM120, штраф за длину пробела 12 и штраф за пробел 4. Дополнительные алгоритмы для анализа последовательности известны в данной области техники и включают ADVANCE и ADAM, как описано в Torellis and Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5; и FASTA, описанный в Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-8. В рамках FASTA, представляет собой опцию управления, которая устанавливает чувствительность и скорость поиска. Если  $ktup=2$ , то находят сходные области в двух сравниваемых последовательностях, просматривая пары выровненных остатков; если  $ktup=1$ , то исследуют отдельно выровненные аминокислоты.  $ktup$  может быть установлен на 2 или 1 для последовательностей белка, или от 1 до 6 для последовательностей ДНК. По умолчанию, если  $ktup$  не указан, то это 2 для белков и 6 для ДНК. Альтернативно, выравнивание последовательности белка может быть выполнено с использованием алгоритма CLUSTAL W, как описано в Higgins и соавт., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402.

[00107] Используемые в контексте настоящей заявки выражения «клетка», «линия клеток» и «культура клеток» применяют взаимозаменяемо, и все такие обозначения включают их потомство. Таким образом, «трансформанты» и «трансформированные клетки» включают первичную рассматриваемую клетку и полученные из нее культуры без учета количества переносов.

[00108] Понятие «млекопитающее» в целях лечения относится к любому животному, классифицируемому как млекопитающее, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных из зоопарков, животных, используемых в спорте, или домашних питомцев, таких как собаки, лошади, кошки, коровы и т.п. Предпочтительно, млекопитающим является человек.

[00109] «Заболевание» или «расстройство», как используют в настоящей заявке, представляет собой любое состояние, при котором может помочь лечение гуманизированным антителом против С3, описанным в настоящей заявке. Сюда входят хронические и острые расстройства или заболевания,

включая те патологические состояния, которые предрасполагают млекопитающих к данному расстройству.

5 [00110] Термин «интравитреальная инъекция» имеет свое обычное значение в данной области техники и относится к введению антитела против СЗ или его антигенсвязывающего фрагмента в стекловидное тело пациента.

10 [00111] Термин «подкожное введение» относится к введению антитела против СЗ или его антигенсвязывающего фрагмента под кожу животного или человеческого пациента, предпочтительно внутрь кармана между кожей и подлежащей тканью, путем относительно медленной, продолжительной доставки из ёмкости для лекарственного средства. Карман может образоваться при защемлении или вытягивании кожи вверх и от подлежащей ткани.

15 [00112] Термин «подкожная инфузия» относится к введению лекарственного средства под кожу пациента-животного или человека, предпочтительно внутри кармана между кожей и подлежащей тканью, путем относительно медленной, длительной доставки из ёмкости для лекарственного средства в течение периода времени, включая, но не ограничиваясь этим, 30 минут или меньше, или 90 минут или меньше. Необязательно, инфузия может быть произведена путем подкожной имплантации насоса для доставки лекарственного средства, имплантированного под кожу пациента-животного или человека, при этом насос доставляет заранее определенное количество лекарственного средства в течение заранее определенного периода времени, например, 30 минут, 90 минут, или периода времени, охватывающего продолжительность схемы лечения.

20 [00113] Термин «подкожный болюс» относится к введению лекарственного средства под кожу пациента-животного или человека, где болюсная доставка лекарственного средства составляет менее чем приблизительно 15 минут; в другом аспекте менее 5 минут и в еще одном аспекте менее 60 секунд. В еще одном аспекте введение осуществляют внутри кармана между кожей и подлежащей тканью, где карман может быть создан путем защемления или  
30 оттягивания кожи вверх и от подлежащей ткани.

[00114] Термин «терапевтически эффективное количество» используют для обозначения количества антитела против СЗ или его антигенсвязывающего фрагмента, которое ослабляет или улучшает один или несколько симптомов заболевания, которое лечат. При этом именно это количество имеет



благоприятный исход для пациента. Эффективность можно измерить обычными способами в зависимости от состояния, которое необходимо лечить. Например, при заболеваниях глаз, характеризующихся клетками, экспрессирующими СЗ, эффективность можно измерить путем определения скорости ответа, например, восстановления зрения, или путем оценки времени задержки до прогрессирования заболевания.

[00115] Термины «лечение» и «терапия» и т.п., используемые в настоящей заявке, предназначены для включения терапевтических, а также профилактических или подавляющих мер в отношении заболевания или расстройства, приводящих к любому клинически желаемому или положительному эффекту, включая, но не ограничиваясь этим, смягчение или ослабление одного или нескольких симптомов, регресс, замедление или прекращение прогрессирования заболевания или нарушения. Таким образом, например, термин «лечение» включает в себя введение антитела против СЗ или его антигенсвязывающего фрагмента до или после появления симптома заболевания или расстройства, тем самым предотвращая или удаляя один или несколько признаков заболевания или расстройства. В качестве другого примера, этот термин включает в себя введение антитела против СЗ или его антигенсвязывающего фрагмента после клинического проявления заболевания для борьбы с симптомами заболевания. Кроме того, введение антитела против СЗ или его антигенсвязывающего фрагмента после начала заболевания и после развития клинических симптомов, когда введение влияет на клинические параметры заболевания или расстройства, независимо от того, приводит ли лечение к улучшению заболевания или нет, включает в себя «лечение» или «терапию», как используют в настоящей заявке. Более того, при условии, что композиции в соответствии с изобретением либо сами по себе, либо в сочетании с другим терапевтическим средством облегчают или улучшают по меньшей мере один симптом заболевания, подлежащего лечению, по сравнению с этим симптомом в отсутствие применения композиции антитела против СЗ или его антигенсвязывающего фрагмента, результат следует рассматривать как эффективное лечение основного заболевания независимо от того, облегчены ли все симптомы расстройства или нет.

[00116] Термин «вкладыш в упаковку» используют для обозначения инструкций, обычно включенных в коммерческие упаковки терапевтических

продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, введении, противопоказаниях и/или предупреждениях, касающихся использования таких терапевтических продуктов.

[00117] Антитело в соответствии с изобретением

5 [00118] В одном варианте осуществления изобретение относится к антителу против С3 или его антигенсвязывающему фрагменту. В конкретном варианте осуществления изобретение относится к гуманизованному антителу против С3 или его антигенсвязывающему фрагменту. В дополнительном варианте осуществления изобретение относится к гуманизованному моноклональному  
10 антителу против С3 или его антигенсвязывающему фрагменту.

[00119] При первоначальной характеристике была создана библиотека антител, нацеленных на С3, в частности scFv, нацеленных на С3. Авторы изобретения гуманизовали и оптимизировали эти scFv, как показано в примере 4. Они дополнительно приступили к дальнейшей разработке CDR и FR с различными изменениями, чтобы улучшить сродство и оптимизировать редко  
15 встречающуюся аминокислоту в человеческом антителе. Путем разнообразных и тщательных шагов по оптимизации изобретатели разработали весьма многообещающие терапевтические молекулы, в частности, гуманизованные scFv, направленные против С3, с улучшенными свойствами, как описано в  
20 настоящей заявке.

[00120] Последовательности CDR антител в соответствии с изобретением показаны в таблице 1 ниже. В таблице 1 представлены CDR по номенклатуре Кабата.

[00121] Таблица 1:

Название	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
CDR-H1	NYAMN	1
CDR-H2	VISYDGSNKYYADSVKG	2
CDR-H2	IINVGGGTNYADSVKG	15
CDR-H3	AVGYHHARLDP	3
CDR-L1	TLSSAHKTYTID	4
CDR-L2	LKSDGSYTKGS	5
CDR-L2	LKSEGSYTKGS	18
CDR-L3	GTEGVGGYV	6

[00122] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную тяжелую цепь (VH) и переменную легкую цепь (VL),

5           – при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 15, последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и

10           – при этом VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 18, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6.

[00123] В конкретном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную тяжелую цепь (VH) и переменную легкую цепь (VL), при этом VH содержит: последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1 или  
15 аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 % или по меньшей мере на 95 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, последовательности CDR-H2 SEQ ID NO: 2 или 15 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 % или по меньшей мере на 95 % идентична  
20 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или 15, и/или последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 % или по меньшей мере на 90 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3; и/или при этом VL содержит: последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4 или  
25 аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 % или по меньшей мере на 95 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 5 или 18 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 % или по меньшей мере на 95 % идентична  
30 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 или 18, и/или последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 % или по меньшей мере 85 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6.

[00124] В конкретном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент

– при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 2, и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 5, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6, или

– при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 15, и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 5, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6,

– при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 15, и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 18, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6, или

– при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 2, и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3 и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 18, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6.

[00125] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

– переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, 22 или 24; и/или

– переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по

меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, 23 или 25.

[00126] В еще одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

– переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, 22 или 24; и

– переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, 23 или 25;

при этом:

– VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 15, последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и

– VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 18, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6.

[00127] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

– переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20; и

– переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21;

при этом:

– VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 2, и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 5, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6.

[00128] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

– переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22; и

– переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23;

при этом:

– VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 15 и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 5, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6.

[00129] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

– переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24; и

– переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25;

при этом:

– VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 15, и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 18, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6.

[00130] В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие: переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20, 22 или 24; и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, 23 или 25.

[00131] В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

а. переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21, соответственно;

б. переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23, соответственно; или

в. переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25, соответственно.

[00132] В еще одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

а. переменную тяжелую цепь, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20 и переменную легкую цепь, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, указанное антитело обозначено как «клон I»,

б. переменную тяжелую цепь, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22 и переменную легкую цепь, содержащую, предпочтительно состоящую из

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, указанное антитело обозначено как «клон II»;

5 в. варибельную тяжелую цепь, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24 и варибельную легкую цепь, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25, указанное антитело обозначено как «клон III».

10 [00133] В следующей таблице представлены CDR антител в соответствии с изобретением согласно различным хорошо известным номенклатурам, таким как по Кабату; в соответствии с CCG (Chemical Computing Group as illustrated in Almagro и соавт., Proteins 2011; 79:3050-3066 and Maier и соавт, Proteins 2014; 82:1599-1610); в соответствии с Chothia; и/или в соответствии с Aho.

[00134] В таблице 2 дополнительно собраны аминокислотные последовательности CDR антител в соответствии с изобретением.

15 [00135] Таблица 2:

Клон	Название	Аминокислотная последовательность	Номенклатура	SEQ ID NO:
Клон I	CDR-H1	NYAMN	Kabat	1
	CDR-H2	VISYDGSNKYYADSVKG	Kabat	2
	CDR-H3	AVGYHHARLDP	Kabat	3
	CDR-L1	TLSSAHKTYTID	Kabat	4
	CDR-L2	LKSDGSYTKGS	Kabat	5
	CDR-L3	GTEGVGGYV	Kabat	6
	CDR-H1	GFTFSNYAMN	CCG	7
	CDR-H2	VISYDGSNKYYADSVKG	CCG	2
	CDR-H3	AVGYHHARLDP	CCG	3
	CDR-L1	TLSSAHKTYTID	CCG	4
	CDR-L2	LKSDGSYTKGS	CCG	5
	CDR-L3	GTEGVGGYV	CCG	6
	CDR-H1	GFTFSNY	Chothia	8
	CDR-H2	SYDGSN	Chothia	9
	CDR-H3	AVGYHHARLDP	Chothia	3
	CDR-L1	TLSSAHKTYTID	Chothia	4
	CDR-L2	LKSDGSYTKGS	Chothia	5
	CDR-L3	GTEGVGGYV	Chothia	6
	CDR-H1	GFTFSNYA	Aho	10
	CDR-H2	ISYDGSNK	Aho	11
CDR-H3	ARAVGYHHARLDP	Aho	12	
CDR-L1	SAHKTYT	Aho	13	
CDR-L2	LKSDGSY	Aho	14	
CDR-L3	GTEGVGGYV	Aho	6	



Клон	Название	Аминокислотная последовательность	Номенклатура	SEQ ID NO:
Клон II	CDR-H1	NYAMN	Kabat	1
	CDR-H2	IINVGGGTNYADSVKG	Kabat	15
	CDR-H3	AVGYHHARLDP	Kabat	3
	CDR-L1	TLSSAHKTYTID	Kabat	4
	CDR-L2	LKSDGSYTKGS	Kabat	5
	CDR-L3	GTEGVGGYV	Kabat	6
	CDR-H1	GFTFSNYAMN	CCG	7
	CDR-H2	IINVGGGTNYADSVKG	CCG	15
	CDR-H3	AVGYHHARLDP	CCG	3
	CDR-L1	TLSSAHKTYTID	CCG	4
	CDR-L2	LKSDGSYTKGS	CCG	5
	CDR-L3	GTEGVGGYV	CCG	6
	CDR-H1	GFTFSNY	Chothia	8
	CDR-H2	NVGGG	Chothia	16
	CDR-H3	AVGYHHARLDP	Chothia	3
	CDR-L1	TLSSAHKTYTID	Chothia	4
	CDR-L2	LKSDGSYTKGS	Chothia	5
	CDR-L3	GTEGVGGYV	Chothia	6
	CDR-H1	GFTFSNYA	Aho	10
	CDR-H2	INVGGGT	Aho	17
CDR-H3	ARAVGYHHARLDP	Aho	12	
CDR-L1	SAHKTYT	Aho	13	
CDR-L2	LKSDGSY	Aho	14	
CDR-L3	GTEGVGGYV	Aho	6	
Клон III	CDR-H1	NYAMN	Kabat	1
	CDR-H2	IINVGGGTNYADSVKG	Kabat	15
	CDR-H3	AVGYHHARLDP	Kabat	3
	CDR-L1	TLSSAHKTYTID	Kabat	4
	CDR-L2	LKSEGSYTKGS	Kabat	18
	CDR-L3	GTEGVGGYV	Kabat	6
	CDR-H1	GFTFSNYAMN	CCG	7
	CDR-H2	IINVGGGTNYADSVKG	CCG	15
	CDR-H3	AVGYHHARLDP	CCG	3
	CDR-L1	TLSSAHKTYTID	CCG	4
	CDR-L2	LKSEGSYTKGS	CCG	18
	CDR-L3	GTEGVGGYV	CCG	6
	CDR-H1	GFTFSNY	Chothia	8
	CDR-H2	NVGGG	Chothia	16
	CDR-H3	AVGYHHARLDP	Chothia	3
	CDR-L1	TLSSAHKTYTID	Chothia	4
	CDR-L2	LKSEGSYTKGS	Chothia	18
	CDR-L3	GTEGVGGYV	Chothia	6
	CDR-H1	GFTFSNYA	Aho	10
	CDR-H2	INVGGGT	Aho	17
CDR-H3	ARAVGYHHARLDP	Aho	12	
CDR-L1	SAHKTYT	Aho	13	

<b>Клон</b>	<b>Название</b>	<b>Аминокислотная последовательность</b>	<b>Номенклатура</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
	CDR-L2	LKSEGSY	Aho	19
	CDR-L3	GTEGVGGYV	Aho	6

[00136] Поэтому, в конкретном аспекте изобретение относится к антителу против С3 или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим переменную тяжелую цепь (VH) и переменную легкую цепь (VL),

5           – при этом VH содержит CDR-H1, выбранную из группы, включающей в себя SEQ ID NO: 1, 7, 8, и 10, последовательность CDR-H2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 9, 11, 15, 16, и 17, последовательность CDR-H3, выбранную из группы, включающей в себя SEQ ID NO: 3 и 12; и

10           – при этом VL содержит последовательность CDR-L1, выбранную из группы, включающей в себя SEQ ID NO: 4 и 13, последовательность CDR-L2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 14, 18 и 19, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6.

[00137] В конкретном аспекте изобретение относится к антителу против С3 или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим переменную тяжелую

15           цепь (VH) и переменную легкую цепь (VL),

20           – при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 7, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 2, и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 5, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6, или

25           – при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 8 последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 9, и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 5, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6, или

30           – при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 10, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 11, и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 12; и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 13, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 14, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6, или

– при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 7, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 15, и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 5, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6, или

5

– при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 8, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 16, и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 5, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6, или

10

– при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 10, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 17, и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 12; и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 13, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 14, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6, или

15

– при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 7, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 15, и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 18, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6, или

20

– при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 8, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 16, и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 18, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6, или

25

– при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 10, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 17, и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 12; и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 13, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 19, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6.

30

[00138] Последовательности типичных переменных тяжелых цепей и переменных легких цепей в соответствии с изобретением представлены в таблице 3.

[00139] Таблица 3:

Название	Последовательность	SEQ ID No
VH - Клон I	QVQLVESGGGGSVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMNWV RQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTASYICARAVGYHHARLDPW GCGTSVTVSS	20
VL - Клон I	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQ QPEKCPRYLMQLKSDGSYTKGSGIPDRFSGSSSGAERY LTISLQSEDEADYYCGTEGVGGYVFGGGTKLTVLG	21
VH - Клон II	QVQLVESGGGGSVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMNWV RQAPGKGLEWVAIINVGGGTNYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTASYICARAVGYHHARLDPWG CGTSVTVSS	22
VL - Клон II	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQ QPEKCPRYLMQLKSDGSYTKGSGIPDRFSGSSSGAERY LTISLQSEDEADYYCGTEGVGGYVFGGGTKLTVLG	23
VH - Клон III	QVQLVESGGGGSVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMNWV RQAPGKGLEWVAIINVGGGTNYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTASYICARAVGYHHARLDPWG CGTSVTVSS	24
VL - Клон III	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQQ QPEKCPRYLMQLKSEGSYTKGSGIPDRFSGSSSGAERY LTISLQSEDEADYYCGTEGVGGYVFGGGTKLTVLG	25

[00140] Последовательности примерных scFv в соответствии с изобретением представлены в таблице 4.

5

[00141] Таблица 4

Название	Последовательность	SEQ ID No
Клон I	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQ QQPEKCPRYLMQLKSDGSYTKGSGIPDRFSGSSSGAER YLTISLQSEDEADYYCGTEGVGGYVFGGGTKLTVLG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGGSVQPGR SLRLSCAASGFTFSNYAMNWV RQAPGKGLEWVAVIS YDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTASYICARAVGYHHARLDPWGCGTSVTVSS	26
Клон I	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWY QQPEKCPRYLMQLKSDGSYTKGSGIPDRFSGSSSGAE RYLTISLQSEDEADYYCGTEGVGGYVFGGGTKLTVL GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGGSVQPG RSLRLSCAASGFTFSNYAMNWV RQAPGKGLEWVAVI SYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTASYICARAVGYHHARLDPWGCGTSVTVSS	27

Клон II	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQ QQPEKCPRYLMQLKSDGSYTKGSGIPDRFSGSSSGAER YLTISLQSEDEADYYCGTEGVGGYVFGGGTKLTVLG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGSVQPGR SLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVAIINV GGGTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT ASYICARAVGYHHARLDPWGCGTSVTVSS	28
Клон II	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWY QQPEKCPRYLMQLKSDGSYTKGSGIPDRFSGSSSGAE RYLTISLQSEDEADYYCGTEGVGGYVFGGGTKLTVL GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGSVQPG RSLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVAIIN VGGGTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TASYICARAVGYHHARLDPWGCGTSVTVSS	29
Клон III	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWYQ QQPEKCPRYLMQLKSEGSYTKGSGIPDRFSGSSSGAER YLTISLQSEDEADYYCGTEGVGGYVFGGGTKLTVLG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGSVQPGR SLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVAIINV GGGTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT ASYICARAVGYHHARLDPWGCGTSVTVSS	30
Клон III	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTIDWY QQPEKCPRYLMQLKSEGSYTKGSGIPDRFSGSSSGAE RYLTISLQSEDEADYYCGTEGVGGYVFGGGTKLTVL GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGSVQPG RSLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVAIIN VGGGTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TASYICARAVGYHHARLDPWGCGTSVTVSS	31

[00142] В одном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением выбирают из группы, включающей в себя одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент Fv, диатело, малый миметик антитела. В альтернативном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент выбирают из групп, состоящих из однодоменного антитела, такого как sdAb, sdFv, нанотело, V-Nar и VHH. В этом конкретном варианте осуществления указанное антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит варибельную тяжелую цепь. В дополнительном варианте осуществления указанная варибельная тяжелая цепь содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 15, последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3. В конкретном варианте осуществления указанная

вариабельная тяжелая цепь содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20, 22 или 24.

5 [00143] В одном варианте осуществления антитело в соответствии с изобретением представляет собой одноцепочечный фрагмент, содержащий линкер, предпочтительно содержащий линкер, указанный в SEQ ID NO: 46 (GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS).

10 [00144] В одном варианте осуществления антитело в соответствии с изобретением представляет собой одноцепочечный фрагмент, включающий в себя одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30 и 31.

[00145] В одном варианте осуществления антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением способны ингибировать пути активации комплемента, включая классический путь (CP), лектиновый путь (LP) и альтернативный путь (AP).

15 [00146] В одном варианте осуществления антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением способны связывать комплемент C3 и C3b.

20 [00147] В одном варианте осуществления антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением способны предотвращать образование конвертазы C3.

[00148] В одном варианте осуществления антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением способны проникать через мембрану Бруха.

25 [00149] В одном варианте осуществления антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением имеет примерно эквивалентное сродство связывания с C3 и C3b.

30 [00150] В одном варианте осуществления антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением имеет сродство связывания с C3a, iC3b, C4, C4b, C5, и/или C5b приблизительно  $10^{-4}$  М или менее (то есть слабее).

[00151] В одном варианте осуществления антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением имеет более слабое сродство связывания с C3a, iC3b, C4, C4b, C5, и/или C5b по сравнению со сродством связывания с C3 и C3b.

[00152] В одном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением не имеет средства связывания с С3а, iС3b, С4, С4b, С5, и/или С5b.

5 [00153] В одном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением способны ингибировать петлю амплификации конвертазы С3.

[00154] В одном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением способны ингибировать хориоидальную активность С3.

10 [00155] Антитело против С3 в соответствии с изобретением или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением связывается с высоким средством с С3 человека. В варианте осуществления, относящемся к этому аспекту, антитело против С3 в соответствии с изобретением связывается с  
15 человеческим С3 при  $K_D < 50$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 15$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 10$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 7$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 1$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,5$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,2$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,15$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,10$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,05$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,04$  нМ, более предпочтительно при  $K_D < 0,03$  нМ,  
20 например, как определено посредством SPR. В одном варианте осуществления антитело против С3 в соответствии с настоящим изобретением связывается с человеческим С3 при  $K_D$ , составляющим от 0,16 до 0,023 нМ, как показано в примере 8.

[00156] В одном варианте осуществления антитело против С3 или его  
25 антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением связывается с человеческим С3b при  $K_D < 50$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 15$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 10$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 7$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 1$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,5$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,2$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,15$  нМ,  
30 предпочтительно при  $K_D < 0,10$  нМ, более предпочтительно при  $K_D < 0,05$  нМ, например, как определено посредством SPR. В дополнительном варианте осуществления антитело против С3 в соответствии с настоящим изобретением связывается с человеческим С3 при  $K_D$ , составляющим от 0,15 нМ до 0,05 нМ, как показано в примере 8.

[00157] В одном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением имеют сродство связывания с С3 и С3b от приблизительно  $10^{-8}$  М до приблизительно  $10^{-14}$  М. В некоторых вариантах осуществления антитело в соответствии с изобретением имеет сродство связывания с С3 и С3b от приблизительно  $10^{-10}$  М до приблизительно  $10^{-12}$  М. В некоторых вариантах осуществления антитела в соответствии с изобретением имеют сродство связывания с С3 и С3b по меньшей мере (сильнее чем) приблизительно  $10^{-8}$  М, по меньшей мере (сильнее чем) приблизительно  $10^{-9}$  М, по меньшей мере (сильнее чем) приблизительно  $10^{-10}$  М, по меньшей мере (сильнее чем) приблизительно  $10^{-11}$  М, или по меньшей мере (сильнее чем) приблизительно  $10^{-12}$  М. В одном варианте осуществления антитело в соответствии с изобретением имеет примерно эквивалентное сродство связывания с С3 и С3b. Например, но никоим образом не ограничиваясь, антитело в соответствии с изобретением может иметь сродство связывания с С3 от приблизительно  $10^{-10}$  М и сродство связывания с С3b от приблизительно  $10^{-10}$  М. В конкретном варианте осуществления антитело в соответствии с изобретением имеет сродство связывания с С3 от приблизительно  $10^{-11}$  М и сродство связывания с С3b от приблизительно  $10^{-11}$  М. В другом варианте осуществления антитело в соответствии с изобретением имеет сродство связывания с С3 от приблизительно  $10^{-12}$  М и сродство связывания с С3b от приблизительно  $10^{-12}$  М.

[00158] В одном альтернативном варианте осуществления сродство связывания с С3 находится в пределах 10-кратной величины от сродства связывания с С3b.

[00159] В одном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением показывает перекрестную реактивность с С3 яванского макака. Авторы изобретения показали в примере 8, что антитела в соответствии с изобретением также связывают С3 яванского макака. С3 яванского макака (*Macaca fascicularis*) на 95,1 % идентичен человеческому С3, а перекрестная реактивность позволяет проводить доклинические и токсикологические испытания антител против С3 в соответствии с изобретением на соответствующей модели животных.

[00160] В одном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением имеет сродство



связывания с релевантным для заболевания С3 однонуклеотидным полиморфизмом (SNP), более конкретно С3 SNP P314L и С3 SNP R102G. Изобретатели также показали в примере 8, что антитело в соответствии с изобретением связывается с релевантным для заболевания SNP человеческого С3, гарантируя, что антитела в соответствии с изобретением могут лечить широкий круг пациентов, страдающих заболеваниями глаз.

[00161] Высокое сродство связывания антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с изобретением способствует продлению времени нейтрализации С3 после интравитреальной инъекции и дополнительно позволяет снизить частоту инъекций. Более высокое сродство связывания позволяет вводить более низкие дозы, ограничивая потенциальные побочные эффекты. Выгодное сродство связывания и уменьшенная частота инъекций значительно повышают эффективность лечения нуждающихся в этом пациентов.

[00162] Благодаря своему высокому сродству связывания, выгодному периоду полувыведения и способности к высокой концентрации антитело против С3 в соответствии с изобретением позволяет увеличить интервал между дозированием. Это также обеспечивает ценные преимущества для пациента, особенно улучшение соблюдения режима приема лекарственного средства.

[00163] Антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением может иметь терапевтически эффективную продолжительность более 1 месяца, что может быть более длительным по сравнению с другими терапевтическими средствами. Увеличение терапевтически эффективной продолжительности может быть обусловлено молярной концентрацией антител против С3 или их антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с изобретением, которая может достигать вплоть до 7 мМ.

[00164] Антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением можно легче инъектировать в глаз по сравнению с другими терапевтическими средствами. В одном варианте осуществления антитела против С3 в соответствии с изобретением не содержат ПЭГ, что снижает их вязкость, как показано в примере 13. Таким образом, ожидается, что вязкость антител против С3 в соответствии с изобретением будет ниже, чем вязкость других терапевтических средств. Растворы с пониженной вязкостью,

например, растворы с вязкостью менее или равной 20 сантипуаз (сП), можно легче инъецировать в глаз из-за пониженного противодавления.

[00165] Авторы изобретения показали, что антитела против С3 или их антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с изобретением обладают превосходными фармацевтическими свойствами, о чем свидетельствует улучшенная стабильность. Изобретатели действительно показали в примере 11, что антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением демонстрирует улучшенную термическую стабильность. Эти результаты показывают, что антитело в соответствии с изобретением остается в своей нативной и активной конформации при физиологической температуре. Примечательно, что более высокие средние точки термического перехода ( $T_m$ ) отражают улучшенную стабильность белка при более низких температурах. Таким образом, авторы изобретения показали, что антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением демонстрирует улучшенную термостабильность, что способствует повышению терапевтической эффективности, в то же время позволяя снизить дозу и частоту инъекций пациентам. Кроме того,  $T_m$  указывает на увеличенный срок хранения и улучшенную стабильность терапевтического продукта во времени.

[00166] В дополнительном аспекте антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением, как было доказано, имеет низкий риск иммуногенности, как описано в примерах 4 и 12. Эти результаты подтверждают, что антитела в соответствии с изобретением являются весьма подходящими и многообещающими для лечения заболеваний глаз, поскольку они демонстрируют низкий риск иммуногенности и/или низкий риск развития антител против лекарственных средств (ADA).

[00167] Система комплемента является важной частью врожденной иммунной системы, которая участвует в повреждении тканей при ряде воспалительных и аутоиммунных заболеваний. Система комплемента включает более 30 клеточно-ассоциированных и циркулирующих белков (например, C1, C1q, C1r, C1s, C2, C3, C3a, C3b, C4, фактор В, фактор D, фактор H, фактор I).

[00168] Существует три основных пути активации комплемента: классический путь (CP), лектиновый путь (LP) и альтернативный путь (AP).

[00169] Три пути комплемента инициируются разными факторами, каждый из которых приводит к расщеплению компонента С3 комплемента.

[00170] Классический путь обычно запускается взаимодействием антигена и специфического антитела правильного изотипа или подкласса; иммуноглобулин М (IgM), IgG3 и IgG1 являются наиболее эффективными активаторами классического пути. Это вызывает конформационные изменения в комплексе C1, позволяющие ему расщеплять C4 и C2 с образованием комплекса C4bC2b. C4bC2b действует как конвертаза C3 классического пути.

[00171] Лектиновый путь комплемента запускается связыванием лектина С-типа, маннан-связывающего лектина (MBL; также известного как маннозо-связывающий лектин) или родственной серии белков, называемых фиколинами (L-фиколин, Н-фиколин и М-фиколин), с конечными сахарами, которые экспрессируются на гликопротеинах или оболочечных полисахаридах, находящихся на поверхности микроорганизмов.

[00172] Альтернативный путь инициируется медленным гидролизом циркулирующего C3, в результате которого обнажается внутренняя тиоэфирная группа, явление, называемое «тиковер C3». Связывание белков, специфичных для альтернативного пути, фактора В, фактора D и пропердина с гидролизованным C3 или с фрагментом расщепления комплемента C3b приводит к дальнейшей активации C3. Расщепленный C3 в форме C3b может затем взаимодействовать с полисахаридами или белками на поверхности микроорганизмов или эндотоксинами (бактериальными липополисахаридами), чтобы инициировать активацию альтернативного пути и генерировать MAC, как это происходит при активации классического пути.

[00173] В некоторых вариантах осуществления антитела против C3 или их антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с изобретением выбраны по их способности ингибировать один или несколько путей комплемента, классический путь, альтернативный путь и лектиновый путь. В некоторых вариантах осуществления антитела против C3 в соответствии с изобретением выбраны по их способности ингибировать все три пути комплемента: классический путь, альтернативный путь и лектиновый путь. В некоторых вариантах осуществления антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением способны ингибировать все три пути комплемента в глазу.

[00174] Обычно функциональная эффективность антител против C3 или их антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с изобретением в

ингибировании классического пути, альтернативного пути и лектинового пути может быть определена с помощью анализа ингибирования комплемента или гемолитического анализа, как описано в примере 7. Эффективность может быть выражена в IC50 (половина максимальной ингибирующей концентрации).

5 Поэтому, в одном варианте осуществления антитело или его фрагмент в соответствии с изобретением

– ингибирует классический путь (CP) с эффективностью от 70 до 80 нМ, измеренной с помощью анализа ингибирования комплемента

10 – ингибирует лектиновый путь (LP) с эффективностью от 340 до 360 нМ, измеренной с помощью анализа ингибирования комплемента, и

– ингибирует альтернативный путь (AP) с эффективностью от 60 до 70 нМ, измеренной с помощью анализа ингибирования комплемента.

[00175] Способность антител против C3 или их антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с изобретением ингибировать все три пути комплемента дополнительно повышает их терапевтический потенциал при лечении заболеваний глаз. В одном варианте осуществления способность антител в соответствии с изобретением ингибировать все три пути комплемента дополнительно улучшает их терапевтический потенциал при лечении заболеваний глаз, в частности ВДЖП или ГА. Не желая ограничиваться теорией, 20 можно сказать, что ингибирование всех трех путей комплемента может улучшить терапевтический потенциал антител против C3 в соответствии с изобретением, предотвращая компенсацию способствующих заболеванию эффектов одного активного пути для других инактивированных путей.

[00176] Поэтому, в конкретном варианте осуществления антитело против 25 C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением способны ингибировать все три пути комплемента в хориоидальной области глаза. Хориоидальная область представляет собой слой, содержащий кровеносные сосуды, который выстилает заднюю часть глаза и расположен между сетчаткой и склерой. Сосудистая оболочка разделена на четыре слоя: 30 слой Галлера, слой Саттлера, хориокапилляры и мембрану Бруха. Мембрана Бруха, также известная как пластинка стекловидного тела, представляет собой самый внутренний слой сосудистой оболочки и прилегает к пигментному эпителию сетчатки (ПЭС). В некоторых вариантах осуществления антитела против C3 в соответствии с изобретением способны проникать или

диффундировать через мембрану Бруха и проникать в другие слои сосудистой оболочки, такие как, помимо прочего, хориокапиллярный слой.

[00177] Сетчатка имеет значительные физические барьеры, которые могут препятствовать проникновению крупных молекул, таких как полноразмерные иммуноглобулины, в более глубокие слои, что может привести к снижению терапевтического эффекта (Jackson и соавт. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44(5): 2141-6). Напротив, более мелкие производные антител могут проникать глубже в сетчатку. Типичные производные антител, имеющие молекулярную массу около 60 кДа или ниже, представляют собой фрагменты антитела, включая, помимо прочего, Fab, фрагмент Fab', scFab, scFv, фрагмент Fv, нанотело, VHH, dAb, V-Nar, sdAb, sdFv, и биспецифические и двухвалентные антитела, такие как одноцепочечные диатела (scDb) или DART. В некоторых вариантах осуществления антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением имеют молекулярную массу приблизительно 60 кДа или менее, например, приблизительно 55 кДа, приблизительно 50 кДа, приблизительно 45 кДа, приблизительно 40 кДа, приблизительно 35 кДа, приблизительно 30 кДа, приблизительно 25 кДа, приблизительно 20 кДа, приблизительно 15 кДа или менее.

[00178] В одном варианте осуществления формат scFv обеспечивает частоту дозирования 3 месяца. Это представляет собой значительное улучшение по сравнению с существующим терапевтическим подходом к лечению заболеваний глаз, который требует более частого введения. Таким образом, scFv в соответствии с изобретением заметно улучшает соблюдение пациентами режима лечения.

[00179] Авторы изобретения показали в примере 10, что антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением (клон I) проявляет высокую диффузионную способность через мембрану Бруха, в частности, по сравнению со сравнительными соединениями A2 и сравнительным соединением A3 как описано в примере 2. Следовательно, в одном варианте осуществления антитела против C3 или их антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с изобретением способны проникать или диффундировать через мембрану Бруха отчасти благодаря их размеру, который достаточно мал для облегчения проникновения. В некоторых вариантах осуществления размер антител в соответствии с изобретением измеряют по молекулярной массе. В

некоторых вариантах осуществления антитела против С3 или их антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с изобретением имеют молекулярную массу приблизительно менее 60 кДа. В некоторых вариантах осуществления антитела против С3 в соответствии с изобретением имеют массу от приблизительно 20 кДа до приблизительно 30 кДа или от приблизительно 10 кДа до приблизительно 20 кДа. В некоторых вариантах осуществления антитела против С3 в соответствии с изобретением имеют массу приблизительно 25 кДа. В некоторых вариантах осуществления антитела против С3 в соответствии с изобретением имеют массу приблизительно 15 кДа. В некоторых вариантах осуществления размер антител против С3 или их антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с изобретением измеряют по их гидродинамическому радиусу. В некоторых вариантах осуществления антитела против С3 в соответствии с изобретением имеют гидродинамический радиус менее или равный приблизительно 3,0 нм. В некоторых вариантах осуществления антитела против С3 в соответствии с изобретением имеют гидродинамический радиус менее или равный приблизительно 2,5 нм. В некоторых вариантах осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением имеют гидродинамический радиус менее или равный приблизительно 2,0 нм.

20 [00180] Гуманизация и варианты аминокислотной последовательности

[00181] Дополнительные варианты антител против С3 и фрагментов антител могут быть сконструированы на основе набора CDR, идентифицированных в последовательностях, представленных в SEQ ID NO: 1 - 6, 15 и 18. Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления, в указанном варианте антител против С3 и фрагментах антител аминокислотная последовательность CDR остается неизменной, но окружающие области, например, области FR, могут быть сконструированы с помощью инженерии. Варианты аминокислотной последовательности антитела против С3 или его фрагментов можно получить путем введения соответствующих нуклеотидных изменений в ДНК антитела против С3 или путем пептидного синтеза. Такие варианты включают в себя, например, делеции из, и/или вставки в и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антител против С3 или их фрагментов из примеров, приведенных в настоящей заявке. Любая комбинация делеций, вставок и замен производится для получения окончательной конструкции при условии, что

конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками. Аминокислотные замены также могут изменить посттрансляционные процессы гуманизированного или вариантного антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента, например, изменение количества или положения сайтов гликозилирования.

[00182] Другой тип аминокислотного варианта антитела включает в себя изменение исходного паттерна гликозилирования антитела. Термин «изменение» в этом контексте означает удаление одного или нескольких углеводных фрагментов, обнаруженных в антителе, и/или добавление одного или нескольких сайтов гликозилирования, которые ранее не присутствовали в антителе.

[00183] В некоторых аспектах настоящее изобретение включает в себя молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют варианты аминокислотной последовательности антител против С3 или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящей заявке. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислотной последовательности антитела против С3 или его фрагмента, получают различными способами, известными в данной области техники. Эти способы включают в себя, помимо прочего, выделение из природного источника (в случае встречающихся в природе вариантов аминокислотной последовательности) или получение с помощью олигонуклеотид-опосредованного (или сайт-направленного) мутагенеза, мутагенеза ПЦР и кассетного мутагенеза ранее полученного варианта или невариантной версии антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента.

[00184] В некоторых вариантах осуществления антитело против С3 в соответствии с изобретением представляет собой фрагмент антитела. Существуют способы, разработанные для получения фрагментов антител. Фрагменты могут быть получены посредством протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto и соавт., 1992, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117; и Brennan и соавт., 1985, *Science* 229:81). Альтернативно, фрагменты могут быть получены непосредственно в рекомбинантных клетках-хозяевах. Например, фрагменты Fab'-SH можно напрямую выделить из *E. coli* и химически соединить с образованием фрагментов F(ab')<sub>2</sub> (см., например, Carter и соавт., 1992, *Bio/Technology* 10:163-167). С помощью другого подхода фрагменты F(ab')<sub>2</sub>

можно выделить непосредственно из рекомбинантной культуры клеток-хозяев. Специалисту в данной области техники будут очевидны другие способы получения фрагментов антител.

5 [00185] Антитела против С3 и их антигенсвязывающие фрагменты могут иметь модификации. Варианты антител, представленных в настоящей заявке, могут быть получены путем введения делеций, замен, дополнений и/или модификаций в каркас и/или в CDR. Затем варианты антител можно протестировать на желаемую функцию с использованием способов, описанных в настоящей заявке. Любые комбинации делеций, замен, добавлений, 10 модификаций и вставок могут быть осуществлены в отношении антигенсвязывающего белка или его фрагмента при условии, что полученный вариант обладает желаемыми характеристиками, по которым его можно скринировать с использованием соответствующих способов.

15 [00186] При использовании в настоящей заявке понятие «консервативная замена» относится к модификации, которая сохраняет функциональные свойства исходного антитела. Например, консервативные аминокислотные замены включают те, в которых аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим аналогичные свойства. Например, заменив аланин (A) на валин (V); заменив аргинин (R) на лизин (K); заменив аспарагин (N) на глутамин (Q); заменив аспарагиновую кислоту (D) на глутаминовую кислоту (E); заменив цистеин (C) на серин (S); заменив глутаминовую кислоту (E) на аспарагиновую кислоту (D); заменив глицин (G) на аланин (A); заменив гистидин (H) на аргинин (R) или лизин (K); заменив изолейцин (I) на лейцин (L); заменив метионин (M) на лейцин (L); заменив фенилаланин (F) на тирозин (Y); заменив 20 серин (S) на треонин (T); заменив триптофан (W) на тирозин (Y); заменив фенилаланин (F) на триптофан (W); и/или заменив валин (V) на лейцин (L) и наоборот.

30 [00187] В некоторых вариантах осуществления может быть желательно использовать фрагмент антитела против С3, а не интактное антитело. Может оказаться желательным модифицировать фрагмент антитела, чтобы увеличить период его полувыведения из сыворотки. Этого можно достичь, например, путем включения эпитопа, связывающего рецептор спасения, во фрагмент антитела. В одном способе соответствующая область фрагмента антитела может быть изменена (например, мутирована) или эпитоп может быть включен в пептидную



метку, которая затем слита с фрагментом антитела на любом конце или в середине, например, путем синтеза ДНК или пептидов. См., например, WO 96/32478.

5 [00188] В других вариантах осуществления настоящее изобретение включает в себя ковалентные модификации антител против СЗ или антигенсвязывающих фрагментов. Ковалентные модификации включают в себя модификацию цистеинильных остатков, гистидильных остатков, лизинильных и аминоконцевых остатков, аргинильных остатков, тирозильных остатков, карбоксильных боковых групп (аспартильных или глутамильных),  
10 глутаминильных и аспарагинильных остатков или серильных или треонильных остатков. Другой тип ковалентной модификации включает в себя химическое или ферментативное связывание гликозидов с антителом. Такие модификации могут быть осуществлены путем химического синтеза или ферментативного или химического расщепления антитела или его фрагмента, если это применимо.  
15 Другие типы ковалентных модификаций антитела могут быть введены в молекулу путем взаимодействия целевых аминокислотных остатков антитела или его фрагмента с органическим дериватирующим агентом, который способен взаимодействовать с выбранными боковыми цепями или амино- или карбокси-концевыми остатками.

20 [00189] Удаление любых углеводных частей, присутствующих на антителе или его фрагменте, можно осуществить химически или ферментативно. Химическое дегликозилирование описано в Nakimuddin и соавт., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 и в Edge и соавт., 1981, Anal. Biochem., 118:131. Ферментативное расщепление углеводных частей на антителах может быть  
25 достигнуто путем использования различных эндо- и экзогликозидаз, как описано в Thotakura и соавт., 1987, Meth. Enzymol 138:350.

[00190] Другой тип полезной ковалентной модификации включает в себя связывание антитела с одним из множества небелковых полимеров, например, полиэтиленгликолем, полипропиленгликолем или полиоксикалканами,  
30 способом, изложенным в одном или нескольких патентах США № 4,640,835, США № 4,496,689, U.S. США № 4,301,144, U.S. США № 4,670,417, США № 4,791,192 и США № 4,179,337.

[00191] Вариант антитела с его антигенсвязывающим фрагментом, описанный в настоящей заявке, такой как варианты, содержащие

последовательность, имеющую определенный уровень % идентичности с последовательностями, раскрытыми в настоящей заявке, предпочтительно сохраняет функциональную способность антител или его антигенсвязывающих фрагментов, описанных выше, например, специфическое связывание эпитопа С3, способное ингибировать пути активации комплемента, включая классический путь (СР), лектиновый путь (LP) и альтернативный путь (AP), способное связывать комплемент С3 и С3b, способное предотвращать образование конвертазы С3 и/или способное проникать через мембрану Бруха.

[00192] Связывание эпитопа

10 [00193] В одном аспекте изобретение обеспечивает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые распознают специфический «эпитоп С3». При использовании в настоящей заявке термин «эпитоп С3» относится к молекуле (например, пептиду) или фрагменту молекулы, способному связываться с антителом против С3 или его антигенсвязывающим фрагментом.

15 Эти термины дополнительно включают в себя, например, антигенную детерминанту С3, распознаваемую любым из антител или антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с настоящим изобретением.

[00194] Эпитопы антигена С3 могут быть включены в белки, белковые фрагменты, пептиды и т.п. Эпитопами чаще всего являются белки, короткие олигопептиды, имитаторы олигопептидов (т.е. органические соединения, которые имитируют свойства связывания антител антигена С3) или их комбинации.

20

[00195] В контексте связывания эпитопа фраза «связывается в пределах аминокислотных областей X-Y...» означает, что антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением связывается по меньшей мере с одним аминокислотным остатком в аминокислотной области, указанной в последовательности.

25

[00196] Антитело или антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением связываются с эпитопом человеческого комплемента С3, как указано в SEQ ID NO: 47. В одном варианте осуществления антитело в соответствии с изобретением связывается с эпитопом цепи D человеческого комплемента. С3с, как указано в SEQ ID NO: 48. SEQ ID No: 48 доступна в интернете по ссылке PDB: 2A74\_D.

30

[00197] Антитело или антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением связываются с эпитопом человеческого комплемента C3, как указано в SEQ ID NO: 47. В другом варианте осуществления антитело в соответствии с изобретением связывается с эпитопом цепи D человеческого комплемента. C3с, как указано в SEQ ID NO: 48. SEQ ID No: 48 доступна в интернете по ссылке PDB: 2A74\_D.

[00198] Было обнаружено, что антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением связывается с уникальным эпитопом человеческого комплемента C3. В одном варианте осуществления антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением связывается с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в остатках от аминокислоты 366 до аминокислоты 478 человеческого комплемента C3, как указано в SEQ ID NO: 47.

[00199] В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается по меньшей мере с одним аминокислотным остатком, выбранным из группы, включающей в себя остатки 366, 392-396, 413-421, 425, 427, 442, 453 и 478 человеческого комплемента C3, как указано в SEQ ID NO: 47.

[00200] В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются со всеми остатками 366, 392-396, 413-421, 425, 427, 442, 453 и 478 человеческого комплемента C3, как указано в SEQ ID NO: 47. В одном варианте осуществления изобретение относится к антителу против C3 или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в остатках от аминокислоты 344 до аминокислоты 456 цепи D человеческого комплемента C3с, как указано в SEQ ID NO: 48.

[00201] В одном варианте осуществления изобретение относится к антителу против C3 или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с по меньшей мере одним остатком, выбранным из группы, включающей в себя остатки 344, 370-374, 391-399, 403, 405, 420, 431 и 456 цепи D человеческого комплемента C3с, как указано в SEQ ID NO: 48.

[00202] В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением связывается со всеми остатками 344, 370-374, 391-399, 403, 405, 420, 431 и 456 цепи D человеческого комплемента C3с, как указано в SEQ ID NO: 48.

5 [00203] В одном варианте осуществления изобретение относится к антителу против C3 или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с по меньшей мере одним аминокислотным остатком в остатках от аминокислоты 369 до аминокислоты 418 цепи D человеческого комплемента C3с, как указано в SEQ ID NO: 48.

10 [00204] В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу против C3 или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывает остатки по меньшей мере одного остатка, выбранного из группы, включающей в себя остатки 369 - 379, 389, 391 - 401, 403 и 418 цепи D человеческого комплемента C3с, как указано в SEQ ID NO: 48.

15 [00205] В другом варианте осуществления антитело в соответствии с изобретением связывает все остатки 369 - 379, 389, 391 - 401, 403 и 418 цепи D человеческого комплемента C3с, как указано в SEQ ID NO: 48.

[00206] Последовательности SEQ ID NO: 47 и 48 изображены в таблице 5 ниже.

20 [00207] Таблица 5:

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
C3 человека	MGPTSGPSLLLLLTHLPLALGSPMYSIITPNILRLESEETMVLEAHD AQQDVPVTVTVHDFPGKKLVLSSEKTVLTPATNHMGNVFTFIPANR EFKSEKGRNKFVTVQATFGTVVEKVVVLSLQSGYLFIQTDKIYTP GSTVL YRIFTVNHKLLPVGRTVMVNIENPEGIPVKQDSLSSQNQLGV LPLSWDIPELVNMGQWKIRAYYENSPQQVFSTEFEVKEYVLPSEFEVI VEPTEKFYYIYNEKGLEVTITARFLYGKKVEGTAFFVIFGIQDGEQRIS LPESLKRIPIEDGSGEVVLSRKVLLDGVQNPRAEDLVGKSLYVSATV ILHSGSDMVQAERSGIPIVTSPIYQIHFTKTPKYFKPGMPFDLMVFT NPDGSPAYRVPVAVQGEDTVQSLTQGDGVAKLSINTHPSQKPLSIT VRTKKQELSEAEQATRTMQALPYSTVGNSNNYLHLSVLRTEL RPGE TLNVNFLLRMDRAHEAKIRYYTYLIMNKGRLKAGRQVREPGQDL VVLPLSITTD FIPSFRLVAYYTLIGASGQREVVADSVWVDVKDSCVG SLVVKSGQSEDRQPVP GQMTLKI EGDHGARVVLVAVDKGVFVLN KKNKLTQSKIWDVVEKADIGCTPGSGKDYAGVFS DAGLFTTSSSGQ QTAQRAELQCPQPAARRRRSVQLTEKRMDKVGKYPKELRKCCEDEG MRENPMRFSCQRRTRFISLGEACKKVFLDCCNYITELRRQHARASH LGLARSNLDEDIIAEENIVSRSEFPESWLWNVEDLKEPPKNGISTKL MNIFLKDSITTWELAVSMSDKKGICVADPFEVTVMQDFFIDLRLPY SVVRNEQVEIRAVLYNYRQNQELKVRVELLHNP AFCSLATTKRRHQ QTVTIPPKSSLSPYVIVPLKTGLQEVEVKA AVYHHFISDGVRKSLK VVPEGIRMNKTVAVRTLDPERL GREGVQKEDIPPADLSDQVPDTE ETRILLQGT PVAQMTEDA VDAERLKH LIVTPSGCGEQNMIGMTPTVI	47

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
	AVHYLDETEQWEKFGLEKRQGALELIKGGYTQQLAFRQPSSAFAAF VKRAPSTWLTAYVVKVFSLAVNLIADSQVLCGAVKWLILEKQKPD GVFQEDAPVIHQEMIGGLRNNNEKDMALTAFVLISLQEAKDICEEQ VNSLPGSITKAGDFLEANYMNLQRSYTVAIAGYALAQMGRLKGPLL NKFLTAKDKNRWEDPGKQLYNVEATSYALLALLQLKDFDFVPPV VRWLNEQRYYGGGYGSTQATFMVFQALAQYQKDAPDHQELNLDV SLQLPSRSSKITHRIHWESASLLRSEETKENEFTVTAEGKGGTSLV VTMYHAKAKDQLTCNKFDLKVTIKPAPETEKRPQDAKNTMILEICT RYRGDQDATMSILDISMMTGFAPDTDLLKQLANGVDRYISKYELD KAFSDRNTLIIYLDK VSHSEDDCLAFKVHQYFNVELIQPGAVKVYA YYNLEESCTRFYHPEKEDGKLNKLCRDELRC AEENCFIQKSDDKV TLEERLDKACEPGVDYVYKTRLVKVQLSNDFDEYIMAIEQTIKSGS DEVVQVGGQRTFISPIKCREALKLEEKKHYLMWGLSSDFWGEKPNLS YIIIGKDTWVEHWPEEDECQDEENQKQCQDLGAFTESMVVFGCPN	
Комплемент C3c из компонента плазмы человека 1 (цепь D)	SPMYSIITPNILRLESEETMVLEAHDAQGDVPVTVTVHDFPGKKLVL SSEKTVLTPATNHMGNVTFITIPANREFKSEKGRNKFVTVQATFGTQ VVEKVVLVSLQSGYLFIQTDKTIYTPGSTVLYRIFTVNHKLLPVGRT VMVNIENPEGIPVKQDSLSSQNQLGVPLPSWDIPELVNMGQWKIRA YYENSPQQVFSTEFEVKEYVLPSEFVIVEPTEKFYIYNEKGLEVTIT ARFLYGKKVEGTAFFVIFGIQDGEQRISLPESLKRIPIEDGSGEVVLSR KVLLDGVQNLRAEDLVGKSLYVSATVILHSGSDMVQAERSGIPIVT SPYQIHFTKTPKYFKPGMPFDLMVFTNPDGSPA YRVPVAVQGEDT VQSLTQGDGVAKLSINTHPSQKPLSITVRTKKQELSEAEQARTMQL ALPYSTVGNSNNYLHLSVLRTEL RPGETLNVNFLLRMDRAHEAKIR YTYLIMNKGRLKAGRQVREPGQDLVVLPLSITDFIPSFRLVAYY TLIGASGQREVVADSVWVDVKDSCVGSLVVKSGQSEDRQPVPGQQ MTLKIEGDHGARVVLVAVDKGVFVLNKNKLTQSKIWDVVEKADI GCTPGSGKDYAGVFS DAGLTFTSSSGQQAQRAELQCPQP	48

[00208] Весьма вероятно, что специфическое связывание с эпитопом C3 приводит к неожиданным функциональным свойствам антител или их антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с настоящим изобретением, например, к высокому сродству связывания как с C3, так и с C3b, а также мощному ингибированию всех трех путей активации комплемента, включая классический путь (CP), лектиновый путь (LP) и альтернативный путь (AP).

[00209] Терапевтическое применение

[00210] В одном аспекте изобретение относится к антителу против C3 или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в качестве лекарственного средства.

[00211] Как упоминалось ранее, авторы изобретения, таким образом, теперь показали, что нейтрализация C3 в сетчатке блокирует петлю амплификации всех путей комплемента и тем самым снижает образование комплекса, атакующего клеточную токсичную мембрану, и образование провоспалительных компонентов комплемента (C3a, C3b, iC3b, C5a), улучшая клинические результаты пациентов, страдающих географической атрофией.

[00212] Следовательно, в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения при лечении или профилактике заболеваний сетчатки или глаз.

5 [00213] В одном аспекте в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения при лечении или предупреждения заболевания глаз. В одном аспекте в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий  
10 фрагмент для применения при лечении или предупреждения заболевания, выбранного из группы, включающей в себя ретинопатию, пролиферативную ретинопатию (ПР), такую как ретинопатия недоношенных, ишемическую ретинопатию, диабетическую ретинопатию (ДР), включая пролиферативную диабетическую ретинопатию (ПДР) и непролиферативную диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек (ДМО), диабетическую макулярную ишемию (ДМИ), возрастную дегенерацию жёлтого пятна (ВДЖП)  
15 включая сухую ВДЖП и влажную ВДЖП, географическую атрофию (ГА), пигментный ретинит, наследственную дистрофию сетчатки, миопическую дегенерацию, окклюзию вен сетчатки, окклюзию артерий сетчатки, эндофтальмит, увеит, кистозный макулярный отек, хориоидальную неоваскулярную мембрану, вторичную по отношению к каким-либо  
20 заболеваниям сетчатки, невропатии зрительного нерва, глаукому, отслойку сетчатки, токсическую ретинопатию, радиационную ретинопатию, травматическую ретинопатию, лекарственную васкулопатию сетчатки, неоваскуляризацию сетчатки, полипloidную хориоидальную васкулопатию, васкулит сетчатки, микроаневризму сетчатки, ретролентальную фиброплазию,  
25 хориоретинит, синдром Ашера, пароксизмальную ночную гемоглобинурию (ПНГ) и болезнь Штаргардта.

[00214] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения при лечении или предупреждения заболевания, выбранного из  
30 группы, включающей в себя возрастную дегенерацию желтого пятна, географическую атрофию, неоваскулярную глаукому и диабетическую ретинопатию. В еще одном предпочтительном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело против С3 или его

антигенсвязывающий фрагмент для применения при лечении или предупреждении географической атрофии.

[00215] В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к scFv против C3 для применения в лечении географической атрофии, при этом указанный scFv против C3 содержит 5 переменную тяжелую цепь (VH), и переменную легкую цепь (VL), при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 15, последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и при этом VL содержит 10 последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 18, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6. В конкретном варианте осуществления указанный scFv против C3 содержит переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 15 21 соответственно. В другом конкретном варианте осуществления указанный scFv против C3 содержит переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23 соответственно. В дополнительном конкретном варианте осуществления указанный scFv против C3 содержит переменную тяжелую цепь и 20 переменную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25 соответственно.

[00216] Авторы изобретения показали, что антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением проявляет более 25 выгодные свойства, чем другие «сравнительные соединения», нацеленные на C3, упомянутые в уровне техники и описанные в примере 5.

[00217] Антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением отличается от терапевтических подходов, основанных на APL2, NGM621 и ZIMURA®.

[00218] APL-2 или пегцетакоплан представляет собой пегилированное 30 производное циклического тридекапептида компстатина (ингибитора компонента комплемента C3). Активным компонентом APL-2 является APL-1. Авторы изобретения разработали суррогатные соединения (сравнительное соединение A1 и сравнительное соединение A2) для целей сравнения, как показано в примере 5A.

[00219] APL-2 имеет большую молекулярную массу, эквивалентную 350 кДа и гидродинамический радиус приблизительно 7,8 нМ, что затрудняет глубокое проникновение в сетчатку. Эффективная продолжительность APL-2 составляет всего 1 месяц, возможно, из-за низкой концентрации, составляющей 5 3,5 мМ. APL-2 также представляет собой ПЭГилованную молекулу, которая увеличивает ее вязкость и может затруднить инъекцию в глаз. Соответственно, существует необходимость более эффективного снижения прогрессирования ГА.

[00220] NGM621 представляет собой гуманизованное моноклональное антитело IgG1, которое эффективно связывает комплемент C3 (C3) и ингибирует 10 активацию комплемента. Авторы изобретения разработали это соединение для целей сравнения, как показано в примере 5B. Было описано, что NGM621 способно ингибировать классический и альтернативный пути.

[00221] ZIMURA® (или авацинкаптад пегол) предназначено для ингибирования расщепления фактора комплемента C5 на C5a и C5b. ZIMURA® 15 не связывается с C3.

[00222] Авторы изобретения показали в примере 6B, что формат антител против C3 или их антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с изобретением улучшает количество доставляемых молекул лекарственного средства в глаз за одну интравитреальную инъекцию. Действительно, показано, 20 что формат scFv может доставлять большее количество лекарственного средства за одну IVT инъекцию по сравнению с другими соединениями. Это подтверждает, что формат scFv может обеспечить большее ингибирование комплемента, усиливая терапевтический эффект. Кроме того, изобретатели показали, что формат scFv обеспечивает лучшее проникновение в сетчатку после 25 IVT инъекции по сравнению с Fab или IgG.

[00223] Авторы изобретения сравнили эффективность антитела против C3 или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с изобретением по сравнению, среди прочего, с производным компстатина, таким как сравнительное соединение A1 и IgG, направленным против C3, таким как 30 сравнительное соединение A3, как показано в примере 7. Авторы изобретения показали, что антитела в соответствии с изобретением ингибируют классический, альтернативный и лектиновый пути более эффективно по сравнению со сравнительным соединением A1 и сравнительным соединением A3. Они также установили, что типичные антитела или их фрагменты в



соответствии с изобретением являются более эффективными в ингибировании СР и LP по сравнению со сравнительным соединением А1. Кроме того, они показали, что эффективность ингибирования АР улучшается в анализе гемолиза по сравнению со сравнительным соединением А1.

5 [00224] Авторы изобретения также привели примеры средства связывания антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению в сравнении с существующими соединениями, производным компстатина, таким как сравнительное соединение А1 и IgG, направленным против С3, таким как сравнительное соединение А3 в примере 8. Высокое  
10 средство связывания типичных антител способствует продлению времени нейтрализации С3 после интравитреальной инъекции и дополнительно позволяет снизить частоту инъекций. Улучшенное средство связывания и снижение частоты инъекций значительно повышают эффективность лечения пациентов. Это также обеспечивает ценные преимущества для пациента, особенно  
15 улучшение соблюдения режима приема лекарственного средства.

[00225] Кроме того, авторы изобретения показали, что антитела против С3 или их антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с изобретением связываются с более высоким средством к С3 и С3b человека по сравнению с производным компстатина, таким как сравнительное соединение А1 и IgG,  
20 направленным против С3, таким как сравнительное соединение А3, что обеспечивает более сильное ингибирование С3. В отличие от сравнительного соединения А3, антитела в соответствии с изобретением связываются с С3b с более высоким средством и, следовательно, блокируют образование С3b в петле амплификации С3, а также активность уже депонированных С3b и С3b,  
25 генерируемых альтернативными путями активации.

[00226] Изобретатели также показали в примере 8, что антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением связывает релевантный для заболевания однонуклеотидный полиморфизм (SNP) человеческого С3, гарантируя, что антителами в соответствии с изобретением  
30 можно лечить широкий круг пациентов, страдающих заболеваниями глаз. Авторы изобретения дополнительно показали, что указанное средство связывания улучшено по сравнению со средством связывания сравнительного соединения А1 с указанным SNP человеческого С3.

[00227] Авторы изобретения показали в примере 10, что антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением обеспечивают улучшенное проникновение через мембрану Бруха, тогда как сравнительное соединение А2 и ZIMURA® не обнаруживают проникновения, а сравнительное соединение А3 проявляет только сниженное проникновение. Поскольку большая часть активности комплемента приходится на область ПЭС/мембраны Бруха/СС, отличное проникновение в ткани и диффузия через мембрану Бруха имеют важное значение для терапевтического подхода к ингибированию пути С3.

[00228] Наконец, антитела против С3 или их антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с изобретением ингибируют все эффекторы комплемента с высоким сродством и эффективностью, как показано в примере 7. Это приводит к ингибированию петли амплификации С3 во всех путях, а также активность уже сформированного С3b и С3b, генерируемая «тиковерной» активацией С3. Результатом является полное ингибирование всех путей активации комплемента и всех эффекторных функций комплемента.

[00229] В заключение, авторы изобретения, таким образом, разработали весьма многообещающую терапевтическую стратегию для лечения пациентов, страдающих ГА, и показали превосходство антител против С3 или их антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с изобретением над сравнительными соединениями А2 и сравнительным соединением А3. Авторы изобретения действительно показали, что антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением:

- обеспечивает улучшенную доставку лекарственного средства путем интравитреальной инъекции (пример 6В) и демонстрирует лучшее проникновение в сетчатку после эквимолярной интравитреальной инъекции, среди прочего, благодаря ее формату;

- имеет улучшенную терапевтически эффективную продолжительность, в частности, благодаря своему формату, обеспечивающему улучшенную частоту дозирования и улучшенное наблюдение за пациентами;

- имеет лучшее проникновение в ткань-мишень (Пример 10) и обладает способностью проникать в ПЭС и мембрану Бруха, тем самым улучшая его терапевтический потенциал при лечении заболеваний глаз;

• обладает улучшенной эффективностью и более эффективной блокадой комплемента, что подтверждает, что антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением ингибирует все эффекторные функции комплемента, обладая высоким сродством и эффективностью (примеры 7 и 8);

• имеет улучшенное сродство связывания с C3, что способствует продлению времени нейтрализации C3 после интравитреальной инъекции и дополнительно позволяет снизить частоту инъекций (пример 8);

• имеет улучшенное сродство связывания с C3b, в частности, антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением связывает C3 и C3b с одинаковым сродством, тем самым обеспечивая ингибирование образования C3b в петле амплификации C3 (пример 8); и

• обладает улучшенным сродством связывания с релевантным для заболевания SNP человеческого C3, гарантируя, что антитела в соответствии с изобретением пригодны для лечения широкого круга пациентов, страдающих заболеваниями глаз (пример 8);

• показывает улучшенную стабильность (примеры 11 и 13); и

• имеет низкий риск иммуногенности (примеры 4 и 12).

[00230] Кроме того, в одном конкретном варианте осуществления изобретения, антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент не являются ПЕГилированными. В этом варианте осуществления антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением демонстрирует снижение риска индукции неоваскуляризации, как это наблюдали в клинических исследованиях, раскрытых в отношении сравнительного соединения, такого как ZIMURA® или APL-2.

[00231] В целом, антитела по настоящему изобретению оказались высокоэффективным средством лечения, с наибольшей продолжительностью эффекта, улучшенной молярной эффективностью препарата, наилучшим соблюдением пациентами и лучшей эффективностью на сетчатке при влажной ВДЖП, в частности при ГА.

[00232] В одном аспекте в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель.

5 [00233] Антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят любым подходящим способом, включая интравитреальное, пероральное, парентеральное, подкожное, внутрибрюшинное, внутрилегочное и интраназальное введение. Парентеральные инфузии включают в себя внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Кроме того, антитело против С3 целесообразно вводить  
10 посредством пульсовой инфузии, особенно со снижающимися дозами антитела. В одном аспекте дозирование осуществляют путем инъекций, наиболее предпочтительно внутривенных или подкожных инъекций, частично в зависимости от того, является ли введение кратковременным или хроническим. В одном варианте осуществления антитело против С3 вводят посредством  
15 интравитреальной инъекции в глаз.

[00234] Для предупреждения или лечения заболевания соответствующая дозировка антитела будет зависеть от множества факторов, таких как тип заболевания, подлежащего лечению, как определено выше, тяжесть и течение  
20 заболевания, вводят ли антитело для профилактики или в терапевтических целях, предыдущая терапия, история болезни пациента и реакция на антитела, а также на усмотрение лечащего врача. Антитело целесообразно вводить пациенту за один раз или в течение серии курсов лечения.

[00235] В некоторых вариантах осуществления диапазон доз антител в соответствии с изобретением применимых для одной инъекции, обычно  
25 составляет от 1 мг/глаз до 20 мг/глаз, или от 5 мг/глаз до 20 мг/глаз, или от 10 мг/глаз до 15 мг/глаз или приблизительно 15 мг/глаз.

[00236] Термин «подавление» используют в настоящей заявке в том же контексте, что и «улучшение» и «облегчение», и означает ослабление или уменьшение одной или нескольких характеристик заболевания.

30 [00237] Композиция антител будет составлена, дозирована и введена способом, соответствующим надлежащей медицинской практике. Факторы, подлежащие рассмотрению в этом контексте, включают конкретное заболевание, подлежащее лечению, конкретного млекопитающего, подлежащего лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причину расстройства, место

5 доставки средства, способ введения, режим введения и другие факторы, известные практикующим врачам. «Терапевтически эффективное количество» антитела, подлежащего введению, будет определяться такими соображениями и представляет собой минимальное количество, необходимое для предотвращения, 5 облегчения или лечения заболеваний глаз, на которые направлено антитело в соответствии с изобретением.

[00238] Антитело может и не быть, но необязательно должно быть составлено с одним или несколькими средствами, используемыми в настоящее время для предотвращения или лечения рассматриваемого расстройства. 10 Эффективное количество таких других средств зависит от количества антитела против СЗ, присутствующего в препарате, типа нарушения или лечения и других факторов, обсуждавшихся выше. Их обычно используют в тех же дозировках и путях введения, которые использовались ранее, или примерно от 1 до 99 % ранее применявшихся доз.

15 [00239] В конкретном аспекте изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело против СЗ или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство.

[00240] Способ лечения

20 [00241] В другом аспекте изобретение также относится к способу лечения или предупреждения заболеваний глаз у нуждающегося в этом пациента, указанный способ включает в себя введение антитела против СЗ или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с изобретением.

[00242] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к 25 способу лечения или предупреждения заболеваний глаз, включающему в себя введение нуждающемуся в этом пациенту фармацевтически эффективного количества антитела или его фрагмента в соответствии с изобретением. В одном варианте осуществления указанное заболевание выбирают из группы, включающей в себя ретинопатию, пролиферативную ретинопатию (ПР), такую как ретинопатия недоношенных, ишемическую ретинопатию, диабетическую 30 ретинопатию (ДР), включая пролиферативную диабетическую ретинопатию (ПДР) и непролиферативную диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек (ДМО), диабетическую макулярную ишемию (ДМИ), возрастную дегенерацию жёлтого пятна (ВДЖП), включая сухую ВДЖП и

влажную ВДЖП, географическую атрофию (ГА), пигментный ретинит, наследственную дистрофию сетчатки, миопическую дегенерацию, окклюзию вен сетчатки, окклюзию артерий сетчатки, эндофтальмит, увеит, кистозный макулярный отек, хориоидальную неоваскулярную мембрану, вторичную по отношению к каким-либо заболеваниям сетчатки, невропатии зрительного нерва, глаукому, отслойку сетчатки, токсическую ретинопатию, радиационную ретинопатию, травматическую ретинопатию, лекарственную васкулопатию сетчатки, неоваскуляризацию сетчатки, полипloidную хориоидальную васкулопатию, васкулит сетчатки, микроаневризму сетчатки, ретролентальную фиброплазию, хориоретинит, дистрофию Фукса, макулярную телеангиэктазию, синдром Ашера, пароксизмальную ночную гемоглобинурию (ПНГ) и болезнь Штаргардта.

[00243] Все раскрытые технические особенности, описанные в настоящей заявке, применимы к указанному способу лечения.

15 [00244] Фармацевтические композиции и их введение

[00245] Композиция, содержащая антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, можно назначать субъекту, страдающему или подверженному риску возникновения заболевания глаз. Кроме того, изобретение предусматривает применение антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения заболевания, связанного с С3. Используемый в настоящей заявке термин «субъект» означает любого пациента-млекопитающего, которому можно вводить антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент включая, например, людей и млекопитающих, отличных от человека, таких как приматы, грызуны и собаки. К субъектам, специально предназначенным для лечения с использованием способов, описанных в настоящей заявке, относят людей. Антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить отдельно или в комбинации с другими композициями.

[00246] Известны различные системы доставки, которые можно использовать для введения антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента. Способы введения включают в себя, помимо прочего, интравитреальное, глазные капли, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Антитело против С3 или его антигенсвязывающий

фрагмент можно вводить, например, путем инфузии, болюса или инъекции, и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным. В предпочтительных вариантах осуществления введение осуществляют посредством интравитреальной инъекции. Составы для таких инъекций могут быть приготовлены, например, в предварительно заполненных шприцах.

[00247] В некоторых вариантах осуществления антитела против С3 или их антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с изобретением вводят внутриглазно. Доставка терапевтических соединений к различным структурам глаза, таким как сетчатка, является сложной задачей. Проблемы включают, помимо прочего, несколько ограничительных глазных барьеров, механизмы слезоотделения, включая моргание и вымывание доставленных соединений, ограниченные объемы местных инъекций, ограниченную местную биодоступность и низкую толерантность к примесям и загрязнителям (см., например, Patel и соавт. *World J Pharmacol.* 2013; 2(2): 47–64; Morrison и соавт. *Ther. Deliv.* 2014; 5(12): 1297-1315). Антитела в соответствии с изобретением могут преодолеть эти проблемы. Согласно изобретению антитела предпочтительно имеют молекулярную массу приблизительно 60 кДа или менее, предпочтительно приблизительно 25 кДа. Примеры антигенсвязывающих белков размером около 60 кДа или менее включают в себя, помимо прочего, фрагменты scFv, V<sub>HH</sub> и Fab. Примеры антигенсвязывающих белков размером около 25 кДа или менее включают, помимо прочего, scFv и V<sub>HH</sub>. Меньший размер scFv позволяет доставлять больше терапевтического соединения за одну инъекцию. Это обеспечивает высокие концентрации антител в глазах. Меньший размер антител в соответствии с изобретением, в частности scFv, может также улучшить их проникновение в ткани, связанные с заболеванием, то есть в хориоидальную область глаза. Антитела в соответствии с изобретением способны проникать в один или несколько слоев хориоидальной области, включая слой Галлера, слой Саттлера, хориокапилляры и мембрану Бруха, тем самым нацеливаясь на комплемент С3 и С3b в этих слоях хориоидальной области.

[00248] В некоторых вариантах осуществления внутриглазное введение достигается с помощью устройства для доставки лекарственного средства, такого как супрахориоидальное устройство для доставки лекарственного средства или субретинальное устройство для доставки лекарственного средства.

Процедуры супрахориоидального введения включают введение лекарственного средства в супрахориоидальное пространство глаза и обычно выполняются с использованием супрахориоидального устройства для доставки лекарственного средства, такого как микроинжектор с микроиглой (см., например, Hariprasad, Retinal Physician; 2016; 13: 20-23; Goldstein, 2014, Retina Today 9(5): 82-87; каждый из которых полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки).

[00249] В некоторых вариантах осуществления внутриглазное введение достигается интравитреальным путем. Интравитреальное введение часто осуществляют с помощью шприца и иглы от 27 до 30 калибра (см., например, Jiang и соавт. *supra*).

[00250] Хотя все эти формы введения явно рассматриваются как входящие в объем настоящего изобретения, формой для введения может быть раствор для инъекции, в частности для интравитреальной инъекции. Обычно подходящая фармацевтическая композиция для инъекции может содержать буфер (например, ацетатный, фосфатный или цитратный буфер), поверхностно-активное вещество (например, полисорбат), необязательно стабилизирующее средство (например, человеческий альбумин) и т.д. Однако в других совместимых способах с помощью представленных в настоящей заявке решений, касающихся антитела в соответствии с изобретением, могут быть доставлены непосредственно к месту расположения неблагоприятной клеточной популяции, тем самым увеличивая воздействие терапевтического средства на больную ткань.

[00251] В альтернативных вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно приготовить в соответствии с обычными методиками в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного или подкожного введения человеку. Обычно композиции для введения путем инъекции представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости фармацевтический препарат также может включать в себя солюбилизирующее средство и местный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Обычно ингредиенты поставляются либо по отдельности, либо смешанными вместе в единичной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизованного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или пакетик, с указанием количества активного вещества. Если лекарственное средство



необходимо вводить путем инфузии, его можно вводить с помощью флакона для инфузии, содержащего стерильную воду фармацевтического качества или физиологический раствор. Если фармацевтический препарат вводят путем инъекции, может быть предоставлена ампула со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, чтобы ингредиенты можно было смешать перед введением.

[00252] Кроме того, фармацевтическая композиция может быть представлена в виде фармацевтического набора, включающего в себя (а) контейнер, содержащий антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением в лиофилизированной форме, и (б) второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый разбавитель. (например, стерильную воду) для инъекций. Фармацевтически приемлемый разбавитель можно использовать для восстановления или разведения лиофилизованного антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента. По выбору к такой емкости(ям) может быть прикреплено уведомление по форме, предписанной правительственным органом, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, и это уведомление отражает одобрение органа по производству, использованию или продаже для применения человеком.

[00253] Количество антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с изобретением, которое эффективно при лечении или профилактике заболеваний глаз, можно определить стандартными клиническими методами. Кроме того, необязательно можно использовать анализы *in vitro*, чтобы помочь определить оптимальные диапазоны доз. Точная доза, которая будет использована в препарате, также будет зависеть от пути введения и стадии заболевания и должна быть определена в соответствии с мнением практикующего врача и обстоятельствами каждого пациента. Эффективные дозы можно экстраполировать по кривым «доза-реакция», полученным на основе тест-систем *in vitro* или на животных моделях.

[00254] Например, токсичность и терапевтическую эффективность антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с изобретением можно определить в культурах клеток или на экспериментальных животных с помощью стандартных фармацевтических процедур определения

ED<sub>50</sub> (доза терапевтически эффективна у 50 % населения). Предпочтительными являются антитела против С3 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые обладают большим терапевтическим индексом.

5 [00255] Данные, полученные в результате анализов на клеточных культурах и исследований на животных, можно использовать при определении диапазона доз для применения у людей. Дозировка антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента обычно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, включающих ED<sub>50</sub>, с небольшой токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от 10 используемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для любого антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента, используемого в способе, терапевтически эффективную дозу можно первоначально оценить на основе анализов клеточной культуры. Доза может быть составлена на животных моделях для достижения диапазона концентраций 15 в циркулирующей плазме, который включает IC<sub>50</sub> (т.е. концентрацию тестируемого соединения, которая обеспечивает полумаксимальное ингибирование симптомов), как определено в клеточной культуре. Такая информация может быть использована для более точного определения полезных доз для человека. Уровни в плазме можно измерить, например, с помощью 20 высокоэффективной жидкостной хроматографии, ELISA и т.п.

[00256] Для интравитреальной инъекции антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с изобретением обычно предпочтительны более длительные интервалы между обработками. Благодаря своей повышенной эффективности антитело против С3 в соответствии с 25 настоящим изобретением можно вводить через более длительные интервалы.

[00257] В одном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением вводят каждые 6 недель, предпочтительно каждые 7 недель, предпочтительно каждые 8 недель, предпочтительно каждые 9 недель, предпочтительно каждые 10 недель, 30 предпочтительно каждые 11 недель, и более предпочтительно каждые 12 недель. В еще одном предпочтительном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением вводят один раз каждые 3 месяца.

[00258] Поскольку объем, который можно ввести в глаз, строго ограничен, очень важно, чтобы антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением можно было приготовить в высоких концентрациях. Кроме того, эффективность антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с изобретением имеет большое значение, поскольку сильнодействующие антитела могут оказывать свое действие даже в более низких дозах и тем самым продлевать активность, а также интервалы между введениями.

[00259] Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть составлены в очень высоких дозах, которые включают в себя, помимо прочего, 20 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл, 50 мг/мл, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 80 мг/мл, 90 мг/мл, 100 мг/мл, 110 мг/мл, 120 мг/мл, 130 мг/мл, 140 мг/мл, 150 мг/мл, 160 мг/мл, 170 мг/мл, 180 мг/мл, 190 мг/мл, 200 мг/мл. Предпочтительно антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением можно приготовить в жидком составе с концентрацией от 90 мг/мл до 180 мг/мл, более предпочтительно от 130 мг/мл до 160 мг/мл состава. Предпочтительно антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением могут быть приготовлены в виде жидкого состава с содержанием приблизительно 150 мг/мл.

[00260] Типичная доза, которую можно вводить пациенту, составляет приблизительно от 2,5 мг/глаз и 20 мг/глаз, или от 7,5 мг/глаз и 15 мг/глаз. В конкретном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением можно вводить пациенту в концентрации 7,5 мг на глаз. В другом конкретном варианте осуществления антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением можно вводить пациенту в концентрации 15 мг на глаз. Типичные буферные компоненты, которые можно использовать для такого состава, включают в себя, например, ацетат натрия, PS20 и дигидрат трегалозы.

[00261] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, содержащие антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент могут дополнительно содержать терапевтическое средство, конъюгированное или неконъюгированное со связывающим средством.

[00262] Что касается терапевтических схем комбинаторного введения, в конкретном варианте осуществления антитело против С3 или его

антигенсвязывающий фрагмент вводят одновременно с терапевтическим средством. В другом конкретном варианте осуществления терапевтическое средство вводят до или после введения антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента, по меньшей мере, за час и до нескольких месяцев, например, по меньшей мере, за час, пять часов, 12 часов, день, неделю, 5 месяц или три месяца до или после введения антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента.

[00263] Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева и рекомбинантные методы

10 [00264] В одном аспекте настоящее изобретение охватывает выделенные полинуклеотиды, которые содержат последовательность, кодирующую антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением, векторы и клетки-хозяева, содержащие полинуклеотиды, а также рекомбинантные методы получения антитела. Выделенные полинуклеотиды 15 могут кодировать любую желаемую форму антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента, включая, например, полноразмерные моноклональные антитела, фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv, диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

20 [00265] Полинуклеотид(ы), которые содержат последовательность, кодирующую антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением, могут быть слиты с одной или несколькими регуляторными или контрольными последовательностями, как известно в данной области, и могут содержаться в пригодных векторах экспрессии или клетке- 25 хозяине, известных в данной области. Каждая из полинуклеотидных молекул, кодирующих переменные домены тяжелой или легкой цепи, может быть независимо слита с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей константный домен, такой как константный домен человека, что позволяет получать интактные антитела. Альтернативно, полинуклеотиды или их части 30 могут быть слиты вместе, образуя матрицу для производства одноцепочечного антитела.

[00266] Для рекомбинантного получения полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, встраивают в реплицируемый вектор для клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии. Доступно

множество подходящих векторов для экспрессии рекомбинантного антитела. Компоненты вектора обычно включают в себя, помимо прочего, одно или несколько из следующих: сигнальную последовательность, точку начала репликации, один или несколько маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции.

[00267] Антитело против СЗ или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению также можно получить в виде слитых полипептидов, в которых указанное антитело или его фрагмент слиты с гетерологичным полипептидом, таким как сигнальная последовательность или другой полипептид, имеющий специфический сайт расщепления на аминоконце зрелого белка или полипептида. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность обычно представляет собой последовательность, которая распознается и обрабатывается (т.е. расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не процессируют сигнальную последовательность антитела против СЗ, сигнальная последовательность может быть заменена прокариотической сигнальной последовательностью. Сигнальной последовательностью может быть, например, щелочная фосфатаза, пенициллиназа, липопротеин, лидеры термостабильного энтеротоксина II и т.п. Для секреции дрожжей нативная сигнальная последовательность может быть заменена, например, лидерной последовательностью, полученной из альфа-фактора дрожжевой инвертазы (включая лидеры  $\alpha$ -фактора *Saccharomyces* и *Kluveromyces*), кислой фосфатазы, глюкоамилазы *S. albicans* или сигнала, описанного в WO 90/13646. В клетках млекопитающих можно использовать сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидеры, например, сигнал gD простого герпеса. ДНК такой области-предшественника лигируют в рамке считывания с ДНК, кодирующей гуманизированное антитело против СЗ или его антигенсвязывающий фрагмент.

[00268] Векторы экспрессии и клонирования содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая позволяет вектору реплицироваться в одной или нескольких выбранных клетках-хозяевах. Обычно в векторах для клонирования эта последовательность позволяет вектору реплицироваться независимо от хромосомной ДНК хозяина и включает точки начала репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо

известны для множества бактерий, дрожжей и вирусов. Начало репликации из плазмиды pBR322 подходит для большинства грамотрицательных бактерий, начало репликации плазмиды 2-0. подходит для дрожжей, а различные вирусные источники происхождения (SV40, полиома, аденовирус, VSV и BPV) пригодны для клонирования векторов в клетках млекопитающих. Как правило, компонент начала репликации не требуется для экспрессирующих векторов млекопитающих (начало SV40 обычно можно использовать только потому, что он содержит ранний промотор).

[00269] Векторы экспрессии и клонирования могут содержать ген, который кодирует селективируемый маркер для облегчения идентификации экспрессии. Типичные селективируемые маркерные гены кодируют белки, которые придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, или, альтернативно, являются ауксотрофными дефицитами компонента, или, в других альтернативах, поставляют специфические питательные вещества, которые не присутствуют в сложных средах, например, ген, кодирующий D-аланинрацемазу для *Bacilli*.

[00270] В одном примере схемы селекции используют лекарственное средство для остановки роста клетки-хозяина. Те клетки, которые успешно трансформируются гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий лекарственную устойчивость, и, таким образом, выживают в режиме селекции. Примерами такого доминантного отбора являются лекарственные средства неомицин, микофеноловая кислота и гигромицин. Обычными селективируемыми маркерами для клеток млекопитающих являются те, которые позволяют идентифицировать клетки, способные поглощать нуклеиновую кислоту, кодирующую гуманизованное антитело против C3, такие как DHFR (дигидрофолатредуктаза), тимидинкиназа, металлотионеин-I и -II (такие как гены металлотионеина приматов), аденозиндезаминаза, орнитиндекарбоксилаза и т.п. Клетки, трансформированные геном селекции DHFR, сначала идентифицируют путем культивирования всех трансформантов в культуральной среде, содержащей метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. Подходящей клеткой-хозяином при использовании DHFR дикого типа является клеточная линия яичника китайского хомячка (CHO), дефицитная по активности DHFR (например, DG44).

[00271] Альтернативно, клетки-хозяева (особенно хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR), трансформированные или совместно трансформированные последовательностями ДНК, кодирующими антитело против СЗ, белок DHFR дикого типа и другой селективируемый маркер, такой как 5 аминокликозид-3'-фосфотрансфераза (APH), могут быть выбраны путем роста клеток в среде, содержащей агент селекции для селективируемого маркера, такой как аминокликозидный антибиотик, например, канамицин, неомицин или G418. См., например, патент США. № 4,965,199.

10 [00272] Если рекомбинантное продуцирование осуществляется в дрожжевой клетке в качестве клетки-хозяина, ген TRP1, присутствующий в дрожжевой плазмиде YRp7 (Stinchcomb и соавт., 1979, Nature 282: 39) может быть использован в качестве селективируемого маркера. Ген TRP1 обеспечивает маркер селекции для мутантного штамма дрожжей, лишенного способности 15 расти в триптофане, например, № ATCC 44076 или PER4-1 (Jones, 1977, Genetics 85:12). Наличие порездения *trp1* в геноме дрожжевой клетки-хозяина обеспечивает эффективную среду для обнаружения трансформации путем роста в отсутствие триптофана. Аналогично, штаммы дрожжей с дефицитом *Leu2p*, такие как ATCC 20,622 и 38,626, дополняются известными плазмидами, несущими ген *LEU2*.

20 [00273] Кроме того, векторы, полученные из кольцевой плазмиды rKD1 размером 1,6 мкм, можно использовать для трансформации дрожжей *Kluyveromyces*. Альтернативно, для *K. Lactis* сообщали о системе экспрессии для крупномасштабного производства рекомбинантного телячьего химозина (Van den Berg, 1990, Bio/Technology 8:135). Также были раскрыты стабильные 25 мультикопийные векторы экспрессии для секреции зрелого рекомбинантного человеческого сывороточного альбумина промышленными штаммами *Kluyveromyces* (Fleeg и соавт., 1991, Bio/Technology 9:968-975).

[00274] Векторы экспрессии и клонирования обычно содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с 30 молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело против СЗ, или ее полипептидной цепью. Промоторы, подходящие для использования с прокариотическими хозяевами, включают в себя промотор *rhoA*, системы промоторов  $\beta$ -лактамазы и лактозы, щелочную фосфатазу, систему промоторов триптофана (*trp*) и гибридные промоторы, такие как промотор *tac*. Пригодны

также другие известные бактериальные промоторы. Промоторы для использования в бактериальных системах также будут содержать последовательность Шайна-Дальгамо (SD), функционально связанную с ДНК, кодирующей гуманизованное антитело против СЗ.

5 [00275] Известны многие эукариотические промоторные последовательности. Практически все эукариотические гены имеют богатую АТ область, расположенную примерно на 25–30 оснований выше места, где инициируется транскрипция. Другая последовательность, обнаруженная на 70–  
10 80 оснований выше начала транскрипции многих генов, представляет собой область CNCAAT, где N может быть любым нуклеотидом. На 3'-конце большинства эукариотических генов находится последовательность AATAAA, которая может быть сигналом для добавления поли-А-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности подходящим образом вставляются в эукариотические векторы экспрессии.

15 [00276] Примеры подходящих промотирующих последовательностей для использования с дрожжевыми хозяевами включают в себя промоторы 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, таких как енолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфатизомераза, 3-  
20 фосфоглицератмутаза, пируваткиназа, триозофосфатизомераза, фосфоглюкозоизомераза и глюкокиназа.

[00277] Индуцибельные промоторы имеют дополнительное преимущество: транскрипция контролируется условиями роста. К ним относятся области дрожжевого промотора алкогольдегидрогеназы 2, изоцитохрома С, кислой  
25 фосфатазы, производных ферментов, связанных с азотистым метаболизмом, металлотионеина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и ферментов, ответственных за утилизацию мальтозы и галактозы. Усилители дрожжей также преимущественно используют с дрожжевыми промоторами.

[00278] Транскрипция антитела против СЗ или его антигенсвязывающего  
30 фрагмента в соответствии с изобретением из векторов в клетках-хозяевах млекопитающих контролируется, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы птиц, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и обезьяний вирус 40



(SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например, промотора актина или промотора иммуноглобулина, или из промоторов теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клеток-хозяев.

5 [00279] Ранние и поздние промоторы вируса SV40 удобно получать в виде рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит точку начала репликации вируса SV40. Непосредственно ранний промотор цитомегаловируса человека удобно получать в виде E-рестрикционного фрагмента HindIII. Система экспрессии ДНК у млекопитающих-хозяев с использованием бычьего вируса папилломы в качестве вектора раскрыта в патенте США № 4,419,446.  
10 Модификация этой системы описана в патенте США № 4,601,978. См. также Reyes и соавт., 1982, Nature 297:598-601, раскрывающие экспрессию кДНК человеческого р-интерферона в клетках мыши под контролем промотора тимидинкиназы из вируса простого герпеса. Альтернативно в качестве промотора можно использовать длинный концевой повтор вируса саркомы  
15 Рауса.

[00280] Другим полезным элементом, который можно использовать в рекомбинантном векторе экспрессии, является энхансерная последовательность, которую используют для увеличения транскрипции ДНК, кодирующей антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с  
20 изобретением, высшими эукариотами. В настоящее время известно множество энхансерных последовательностей из генов млекопитающих (например, глобина, эластазы, альбумина,  $\alpha$ -фетопротеина и инсулина). Однако обычно используют энхансер из вируса эукариотических клеток. Примеры включают энхансер SV40 на поздней стороне начала репликации (100-270 п.н.), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы на поздней стороне начала репликации и энхансеры аденовируса. См. также Yaniv, 1982, Nature 297:17-18  
25 для описания элементов, усиливающих активацию эукариотических промоторов. Энхансер может быть сплайсирован в вектор в положении 5' или 3' относительно последовательности, кодирующей антитело против С3, но предпочтительно он  
30 расположен в сайте 5' от промотора.

[00281] Векторы экспрессии, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (дрожжи, грибы, насекомые, растения, животные, люди или ядросодержащие клетки других многоклеточных организмов), также могут содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и

стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно доступны из 5'-а иногда и 3'-нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые как полиаденилированные фрагменты в нетранслируемой части мРНК, кодирующей антитело против СЗ или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением. Одним из полезных компонентов терминации транскрипции является область полиаденилирования бычьего гормона роста. См. WO 94/11026 и описанный в ней вектор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления антитела против СЗ можно экспрессировать с использованием системы SNEF (см., например, патент США № 5,888,809).

[00282] Подходящими клетками-хозяевами для клонирования или экспрессии ДНК в векторах в настоящей заявке являются прокариотические, дрожжевые или высшие эукариотические клетки, описанные выше. Подходящие для этой цели прокариоты включают эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, *Enterobacteriaceae*, такие как *Escherichia*, например, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescans* и *Shigella*, а также *Bacilli*, такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis* (например, *B. licheniformis* 41 P, раскрытые в DD 266,710 опубликовано 12 апреля 1989 г.), *Pseudomonas*, такие как *P. aeruginosa* и *Streptomyces*. Одним из предпочтительных хозяев *E. coli* для клонирования является *E. coli* 294 (ATCC 31,446), хотя пригодны и другие штаммы, такие как *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537) и *E. coli* W3110 (ATCC 27,325). Эти примеры являются скорее иллюстративными, чем ограничивающими.

[00283] Помимо прокариотов, подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела против СЗ, являются эукариотические микробы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи. *Saccharomyces cerevisiae*, или обычные пекарские дрожжи, наиболее часто используют среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Однако ряд других родов, видов и штаммов обычно доступны и полезны в данном случае, такие как *Schizosaccharomyces pombe*; хозяева *Kluyveromyces*, такие как, например, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilorum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, и *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastors*

(EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, такие как *Schwanniomyces occidentalis*; и нитчатые грибы, такие как, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyocladium* и хозяева *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* и *A. niger*.

5 [00284] Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента происходят из  
многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают в себя  
клетки растений и насекомых, включая, например, многочисленные штаммы и  
10 варианты бакуловирусов и соответствующие перmissive клетки-хозяева  
насекомых от хозяев, таких как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti*  
(комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка) и  
*Bombyx mori* (шелкопряд). Различные вирусные штаммы для трансфекции  
общедоступны, например, вариант L-1 *Autographa californica NPV* и штамм Bm-5  
*Bombyx mori NPV*, и такие вирусы можно использовать, в частности, для  
15 трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

[00285] В качестве хозяев также можно использовать культуры растительных клеток хлопчатника, кукурузы, картофеля, соевых бобов, петунии, томата и табака.

[00286] Антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в  
20 соответствии с изобретением также можно включать в вирусные векторы, т.е.  
полинуклеотид, кодирующий антитело против С3 или его антигенсвязывающий  
фрагмент, вводится в вирусный вектор, а затем экспрессируется в организме  
пациента после заражения вирусом.

[00287] В другом аспекте экспрессия антитела против С3 или его  
25 антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с изобретением осуществляется  
в клетках позвоночных. Размножение клеток позвоночных в культуре (культуре  
тканей) стало рутинной процедурой, и методы широко доступны. Примерами  
полезных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почек  
обезьяны, трансформированная посредством SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651),  
30 линия эмбриональных почек человека (клетки 293 или 293, субклонированные  
для роста в суспензионной культуре) (Graham и соавт., 1977, J. Gen Virol. 36:  
59), клетки почек детенышей хомяка (ВНК, ATCC CCL 10), клетки яичников  
китайского хомячка/-DHFR1 (CHO, Urlaub и соавт., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci.  
USA 77: 4216; например, DG44), клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, 1980, Biol.

Reprod. 23:243-251), клетки почек обезьяны (CV1 ATCC CCL 70), клетки почек африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587), клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2), клетки почек собаки (MDCK, ATCC CCL 34), клетки печени серой крысы (BRL 3A, ATCC CRL 1442), клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75), клетки печени человека (Hep G2, HB 8065), опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51), клетки TR1 (Mather и соавт., 1982, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68), клетки MRC 5, клетки FS4 и линия гепатомы человека (Hep G2).

10 [00288] Клетки-хозяева трансформируют описанными выше векторами экспрессии или клонирования для получения антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индуцирования промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

15 [00289] Клетки-хозяева, используемые для продукции антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с изобретением, можно культивировать в различных средах. Коммерчески доступные среды, такие как Ham's F10 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma-Aldrich Co.), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co.), и модифицированная по  
20 Дульбекко среда Игла ((DMEM), Sigma-Aldrich Co.) пригодны для культивирования клеток-хозяев. In Кроме того, для культивирования клеток-хозяев подходят любые среды, описанные в одном или нескольких работах Ham и соавт., 1979, Meth. Enz. 58: 44, Barnes и соавт., 1980, Anal. Biochem. 102: 255, патент США № 4,767,704, патент США № 4,657,866, патент США № 4,927,762,  
25 патент США № 4,560,655, патент США № 5,122,469, WO 90/103430 и WO 87/00195 можно использовать в качестве культуральной среды для клеток-хозяев. При необходимости любая из этих сред может быть дополнена гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальций, магний и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (например, аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как гентамицин), микроэлементами (определяемые как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне), и и  
30 глюкоза или эквивалентный источник энергии. Другие добавки также могут

быть включены в соответствующих концентрациях, которые известны специалистам в данной области. Условия культивирования, такие как температура, рН и т.п., являются теми, которые ранее были использованы с клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии, и будут очевидны для  
5 специалиста стандартного уровня подготовки.

[00290] При использовании рекомбинантных методов антитело или его фрагмент можно получать внутриклеточно, в периплазматическом пространстве или непосредственно секретировать в среду. Если антитело вырабатывается  
10 внутриклеточно, на первом этапе клетки могут быть разрушены с высвобождением белка. Частичный дебрис, либо клетки-хозяева, либо лизированные фрагменты, можно удалить, например, центрифугированием или ультрафильтрацией. Carter и соавт., 1992, *Bio/Technology* 10:163-167 описывает процедуру выделения антител, которые секретированы в периплазматическое пространство *E. coli*. Вкратце, клеточную пасту оттаивают в присутствии  
15 ацетата натрия (рН 3,5), EDTA и фенолметилсульфонилфторида (PMSF) в течение приблизительно 30 минут. Клеточный дебрис можно удалить центрифугированием. Если антитело секретировано в среду, супернатанты из таких систем экспрессии обычно сначала концентрируют с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрации белка, например,  
20 устройства для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. Ингибитор протеазы, такой как PMSF, может быть включен в любую из предшествующих стадий для ингибирования протеолиза, а антибиотики могут быть включены для предотвращения роста посторонних примесей. Для выделения антитела из клетки-хозяина можно использовать различные методы.

[00291] Композицию антител, полученную из клеток, можно очистить, используя, например, хроматографию на гидроксилатапате, гель-электрофорез, диализ и аффинную хроматографию, причем типичным методом очистки является аффинная хроматография. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изоформа любого Fc домена иммуноглобулина,  
25 присутствующего в антителе. Белок А можно использовать для очистки антител, основанных на тяжелых цепях гамма1, гамма2 или гамма4 человека (см., например, Lindmark и соавт., 1983 *J. Immunol. Meth.* 62:1-13). Белок G рекомендуется для всех изоформ мыши и для гамма3 человека (см., например, Guss и соавт., 1986 *EMBO J.* 5:1567-1575). Матрица, к которой присоединен

аффинный лиганд, чаще всего представляет собой агарозу, но доступны и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензол, позволяют добиться более высоких скоростей потока и более короткого времени обработки, чем можно достичь с помощью агарозы. Если антитело содержит домен  $C_{H3}$ , для очистки можно использовать смолу ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.). Другие методы очистки белков, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на диоксиде кремния, хроматография на гепарине SEPHAROSE™, хроматография на анионной или катионообменной смоле (например, колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, В зависимости от извлекаемого антитела также доступны SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония.

[00292] После любого этапа предварительной очистки смесь, содержащая интересующее антитело или его фрагмент и примеси, может быть подвергнута хроматографии с гидрофобным взаимодействием при низком pH с использованием элюирующего буфера при pH примерно 2,5-4,5, обычно выполняемой при низких концентрациях соли (например, примерно от 0 до 0,25 М соли).

[00293] Также включены нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в условиях низкой, умеренной и высокой строгости, как определено в настоящей заявке, со всей или частью (например, частью, кодирующей вариабельную область) нуклеотидной последовательности, представленной изолированной полинуклеотидной последовательностью(ями), которая кодирует антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением. Гибридирующаяся часть гибридирующейся нуклеиновой кислоты обычно имеет длину по меньшей мере 15 (например, 20, 25, 30 или 50) нуклеотидов. Гибридирующаяся часть гибридирующейся нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 80 %, например, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 % или по меньшей мере 98 %, идентична последовательности части или всей нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид против С3 (например, вариабельная область тяжелой цепи или легкой цепи), или его комплемент. Гибридирующиеся нуклеиновые кислоты типа, описанного в настоящей заявке,

можно использовать, например, в качестве зонда для клонирования, праймера, например, праймера для ПЦР, или диагностического зонда.

5 [00294] В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду или полинуклеотидам, содержащим последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, или SEQ ID NO: 24, и последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 и или ID NO: 25.

10 [00295] Следует понимать, что в указанных антителах против С3 и фрагментах антител последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CDR, остается неизменной (неизменной по отношению к аминокислоте, которую они кодируют, возможны эквиваленты последовательности ДНК из-за вырожденности кодонов), но окружающие области, например, области FR могут быть сконструированы.

15 [00296] Изделия промышленного производства

[00297] В другом аспекте предлагается изделие промышленного производства, содержащее материалы, пригодные для лечения описанных выше расстройств. Изделие промышленного производства включает в себя емкость и этикетку. Подходящими емкостями являются, например, бутылки, флаконы, шприцы и пробирки. Емкости могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Емкость содержит композицию, которая эффективна для лечения состояния и может иметь стерильное отверстие для доступа. Например, емкость может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, пробиваемую иглой для подкожных инъекций. Активное средство в композиции представляет собой антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением. Этикетка на емкости или связанная с емкостью указывает, что композицию используют для лечения выбранного состояния. Изделие может дополнительно содержать вторую емкость, содержащую фармацевтически приемлемый буфер, такой как забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Оно может дополнительно включать в себя другие материалы, необходимые с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковки с инструкциями по применению.

20

25

30

[00298] Изобретение дополнительно описано в следующих примерах, которые не предназначены для ограничения объема изобретения.

Примеры

[00299] Пример 1: Механизмы С3 и этиология географической атрофии

5 [00300] У пациентов с ГА повышенная и неконтролируемая активация системы комплемента приводит к разрушению хориокапилляров, повреждению клеток ПЭС и, в конечном итоге, к потере фоторецепторов.

[00301] Значимость активации комплемента для патофизиологии заболевания основана на следующих моментах:

10 [00302] *А. Экспрессия белков комплемента и активация системы комплемента в сетчатке у пациентов с ВДЖП*

[00303] Было обнаружено, что все белки каскада комплемента экспрессируются локально в разных типах клеток сетчатки. У пациентов уровни белка нескольких факторов комплемента (например, С3, СФВ и С5) повышаются в друзах и поражениях ГА. Кроме того, было обнаружено повышение уровней продуктов активации комплемента С3а, С4а, С3d, СВb во внутриглазной жидкости и плазме пациентов с ВДЖП. Иммуногистохимическое окрашивание мембраноатакующего комплекса (МАС) показывает повышенное его отложение в мембране Бруха, слое ПЭС и хориокапиллярах вблизи поражений ГА у

15

20

20

пациентов.

[00304] *В. Генетика ВДЖП*

[00305] Исследования GWAS выявили полиморфизм Y402H фактора комплемента Н (CFH) как основной фактор риска развития ВДЖП. У лиц, гомозиготных по этой мутации, риск был повышен до 7 раз. CFH является

25

основным негативным регулятором системы комплемента. Он усиливает распад конвертазы С3 С3bBb и регулирует протеолитическую деградацию уже отложенного С3b. У гомозиготных пациентов был обнаружен полиморфизм Y402, приводящий к снижению связывания CFH с другими белками и повышению уровня продуктов активации комплемента, а также к увеличению

30

отложения МАС. Кроме того, полиморфизмы в других генах комплемента (например, СФВ, С3, С7, С9) были связаны с развитием ВДЖП.

[00306] *С. Клинические исследования ингибиторов комплемента*

Существующие терапевтические стратегии, включая лечение ингибитором С3 (APL-2) и ингибитором С5 (ZIMURA®), снижали рост поражений ГА в



клинических исследованиях фазы 2. Ингибирование C3 будет ингибировать петлю амплификации C3 и, следовательно, ингибировать альтернативный, классический и лектиновый путь системы комплемента.

[00307] Пример 2: Создание и характеристика библиотеки антител против

5 C3

[00308] Для получения антител против C3 трех новозеландских белых кроликов иммунизируют нативным человеческим белком C3. Каждое животное получает 4 инъекции белка C3 в разные моменты времени с полным или неполным адъювантом Фрейнда. Иммунный ответ каждого животного тестируют с помощью ELISA, и титры специфических антител в сыворотке указывают на отличный иммунный ответ.

10

[00309] Библиотеки кДНК антител scFv конструируют из РНК, экстрагированной из выделенных кроличьих РВМС и лимфоцитов селезенки посредством амплификации ПЦР. Кодирующие последовательности переменных легких и тяжелых доменов амплифицируются отдельно и связываются посредством серии перекрывающихся этапов ПЦР с получением конечных продуктов scFv.

15

[00310] Амплифицированные последовательности ДНК, кодирующие scFv кроликов, расщепляют с использованием соответствующих ферментов рестрикции и лигируют в фагемидные векторы. Фагемидные векторы трансформируются в электрокомпетентные клетки *E. coli* TG1, которые хорошо подходят для создания библиотеки фагового дисплея антител.

20

[00311] Пример 3: Скрининг антитела против C3, которое ингибирует все три пути комплемента

[00312] Для скрининга антител против C3 с высоким сродством scFv, представленные на фагах, подвергают нескольким раундам биопэннинга (отбора) против нативного человеческого C3. Строгость отбора увеличивается с каждым раундом либо за счет уменьшения концентрации белка C3, используемого в биопэннинге, либо за счет увеличения строгости промывок. Приблизительно 380 моноклональных фагов отбирают и проверяют на их способность связывать C3 в анализах ELISA.

30

[00313] На основании данных фагового ELISA и отпечатков ДНК отбор отображаемых scFv производится рекомбинантно в виде белков антител в

формате Fab. Полученные белки оценивают на их способность связывать C3 и C3b человека.

[00314] Для выявления антител, блокирующих все 3 пути комплемента, антитела проверяют с помощью иммуноферментного анализа для качественного определения функциональных классических, лектиновых и альтернативных путей комплемента в сыворотке человека с использованием Complement system Screen WEISLAB® (Svar Life Science AB, Malmö, Sweden). Клон IV (SEQ ID NO: 32) был идентифицирован как способный ингибировать все три пути комплемента, как показано в таблице 6.

10 [00315] Таблица 6. Ингибирование пути комплемента клоном IV при однократной дозе 2 мкМ для зависимого от КП, ЛП и АП образования MAC.

активация комплемента клоном IV [%]		
Классический путь	Лектиновый путь	Альтернативный путь
2.9 ± 0.0	0.5 ± 0.9	-0.1 ± 0.2

[00316] Последовательность клона IV показана в следующей таблице 7.

[00317] Таблица 7:

Название	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
Клон IV	QSVKESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLYNYAM NWVRQAPGKGLEWIGIINTDGNTNYASWAKGR FTISTTSSTTVDLKITSPTTEDTATYFCPRAVGYH HHALDPWGPGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGASELVLTQSPSVSAALGASAKLTCTLSSA HKTYTIDWYQQQQGEAPRYLMQLKSDGSYTKG TGVPDRFSGSSSGADRYLIIPSVQADDEADYYCG TDYGGGYVFGGGTQLTVTG	32

15 [00318] Пример 4: Кампания по переформатированию, гуманизации и оптимизации

20 [00319] *Переформатирование и гуманизация:* Для гуманизации антитела и переформатирования в формат фрагмента антитела scFv последовательности CDR клона IV, полученные из кролика, прививают в переменные домены легкой цепи (VL) и переменной области тяжелой цепи (VH) последовательностей зародышевой линии человека. Для гуманизации VH, CDR прививают в каркас IMGT\_hVH\_3\_30. Для гуманизации VL, CDR прививают в каркас IMGT\_hVL\_4-69. Переменные домены соединяются с использованием

линкера (GGGS)<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 46) по схеме VL-линкер-VH. Для каркаса 4 используют IGLJ2\*01 последовательность гена соединения IGLJ2\*01 (J).

5 [00320] Переформатированный и гуманизированный вариант клона V (SEQ ID NO: 33) сохраняет свою способность ингибировать классический и альтернативный пути комплемента, но демонстрирует более низкое сродство связывания с C3 и C3b, чем исходная молекула клона IV.

10 [00321] Вариант дополнительно модифицируется путем замены дополнительных аминокислот, полученных из кролика, на последовательности зародышевой линии, создавая тем самым клон VI (SEQ ID NO: 34). Его сродство с человеческим C3 и C3b было сопоставимо с родительской молекулой, а термостабильность конструкции увеличилась на 11,7 °C.

[00322] Последовательности клона V и клона VI обобщены в следующей таблице 8.

[00323] Таблица 8:

Название	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
Клон V	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTI DWYQQQPEKGPRYLMQLKSDGSYTKGTGVPDR FSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYYCGTDYGGG YVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SQVQVVESGGGSVQPGRSLRLSCAASGFSLYNY AMNWVRQAPGKGLEWIGIINTDGNTNYASWAK GRFTISTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTASYCPR AVGYHHHALDPWGQGTSVTVSS	33
Клон VI	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTI DWYQQQPEKGPRYLMQLKSDGSYTKGTGVPDR FSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYYCGTDYGGG YVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SQVQVVESGGGSVQPGRSLRLSCAASGFSLYNY AMNWVRQAPGKGLEWIGIINTDGNTNYASWAK GRFTISTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTASYCAR AVGYHHHALDPWGQGTSVTVSS	34

15

[00324] *Созревание*

[00325] Создание библиотеки: для улучшения сродства молекулы создают библиотеки насыщения сайтов с использованием клона VI (SEQ ID NO: 34) в качестве матрицы. Рандомизация выполняется на CDR L1, L2, L3 и H3.

20 [00326] Биопэннинг: библиотеки, содержащие рандомизированные легкие цепи, объединяют в одну библиотеку. Подобным образом, библиотеки,

содержащие рандомизированные цепи тяжелых цепей, объединяют в другую библиотеку. Библиотеки легких и тяжелых цепей подвергают биоэпэннингу против С3 человека. Во втором, третьем и четвертом раундах биоэпэннинга (ROP2-4) вводят конкуренцию с клоном IV в концентрации 50 мкг/мл, чтобы  
 5 повысить строгость отбора и позволить идентифицировать связывающие вещества с более высоким сродством, чем исходная молекула. Совпадения, выявленные с помощью фагового ELISA в ROP2-4 подвергают секвенированию. Наиболее перспективные кандидаты из ROP4 экспрессируют и очищают в формате scFv.

10 [00327] Характеристика совпадения: Все совпадения, выявленные в ROP4, содержат аминокислотные замены в CDR L3 или CDR H3.

[00328] Все совпадения были успешно экспрессированы и очищены. Наилучшее сродство связывания с С3 и С3b человека наблюдали у клона VII (SEQ ID NO: 35), клона VIII (SEQ ID NO: 36) и клона IX (SEQ ID NO: 37) со  
 15 сродством С3 1,1 нМ, 184 рМ и 1,3 нМ, соответственно.

[00329] Клон VII и клон IX показали сравнимое сродство связывания и активность ингибирования комплемента с исходной молекулой клона IV. Клон VIII продемонстрировал примерно 10-кратное увеличение сродства связывания с С3 и С3b, и превосходные характеристики в анализах ингибирования  
 20 комплемента по сравнению с клоном IV.

[00330] Последовательности клонов VII, VIII и IX приведены в следующей таблице 9.

[00331] Таблица 9:

Название	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
Клон VII	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTI DWYQQQPEKGPRYLMQLKSEGSYTKGTGVPDR FSGSSSGAERYLTISLQSEDSAVYYCGTEGVGG YVFGCGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SQVQVVESGGGSVQPGRSLRLSCAVSGFSLYNY AMNWVRQAPGKCLEWIGIINVGGGTNYASWAK GRFTISTDNSKNTVYLQMNSLRAEDTASYCAR AVGYHHHALDPWGQGTSTVTVSS	35
Клон VIII	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTI DWYQQQPEKGPRYLMQLKSEGSYTKGTGVPDR FSGSSSGAERYLTISLQSEDSAVYYCGTEGVGG YVFGCGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SQVQVVESGGGSVQPGRSLRLSCAVSGFSLYNY	36

Название	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
	AMNWVRQAPGKCLEWIGIINVGGGTNYASWAK GRFTISTDNSKNTVYLQMNSLRAEDTASYICAR AVGYHHSRLDPWGQGTSTVTVSS	
Клон IX	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTI DWYQQQPEKGPRLMQLKSEGSYTKGTGVPDR FSGSSGAERYLTISLQSEDSAVYYCGTDGVGG YVFGCGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SQVQVVESGGGSVQPGRSLRLSCAVSGFSLYNY AMNWVRQAPGKCLEWIGIINVGGGTNYASWAK GRFTISTDNSKNTVYLQMNSLRAEDTASYICAR AVGYHNSRLDPWGQGTSTVTVSS	37

[00332] *Стабилизация scFv*

[00333] Стабилизацию scFv осуществляли введением дисульфидного мостика (VL 43C, VH 105C). Природные антитела имеют консервативный межцепочечный дисульфидный мостик между константными легкими и константными тяжелыми доменами CH1, который сильно стабилизирует взаимодействие между легкой и тяжелой цепями. Отсутствие этой межцепочечной дисульфидной связи в scFv может привести к дестабилизации переменного домена и образованию димеров, тримеров и видов высших олигомеров, особенно при приготовлении в высоких концентрациях. Таким образом, наличие дисульфидной связи может стабилизировать интерфейс VH/VL scFv.

[00334] Стабильность каркаса тяжелой цепи клона VI исследовали путем введения замен каркаса, создавая тем самым, среди прочего, клон X (SEQ ID NO: 38). Клон X и его вариант, стабилизированный дисульфидной связью, клон XI (SEQ ID NO: 39) сравнивали в исследовании стабильности при 37 °C и концентрации белка >100 мг/мл. Двухнедельная инкубация клона XI при 37 °C привела к потере чистоты мономеров только на 3,3 %, тогда как исходная молекула клона X потеряла 60,4 % содержания мономеров (таблица 10).

[00335] Таблица 10: Зависимая от концентрации мономерная стабильность стабилизированного дисульфидной связью клона XI scFv и родительской молекулы клона X при 37 °C.

Параметр	Клон XI	Клон X
Концентрация в начале	152 мг/мл	100 мг/мл
Мономерное содержание в начале	99,8 %	99,7 %
Содержание мономеров через 2 недели при	96,5 %	39,3 %

37 °C		
-------	--	--

[00336] Последовательности клонов X и XI приведены в следующей таблице 11.

[00337] Таблица 11:

Название	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
Клон X	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTI DWYQQQPEKGPRYLMQLKSDGSYTKGTGVPDR FSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYYCGTDYGGG YVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SQVQVVESGGGSVQPGRSLRLSCTVSGFSLYNY AMNWVRQAPGKGLEWIGIINTDGNTNYASWAK GRFTISTDNSKNTVYLMNSLRAEDTASYCAR AVGYHHHALDPWGQGTSVTVSS	38
Клон XI	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTI DWYQQQPEKCPRYLMQLKSDGSYTKGTGVPDR FSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYYCGTDYGGG YVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SQVQVVESGGGSVQPGRSLRLSCTVSGFSLYNY AMNWVRQAPGKGLEWIGIINTDGNTNYASWAK GRFTISTDNSKNTVYLMNSLRAEDTASYCAR AVGYHHHALDPWGCGTSVTVSS	39

5

[00338] *Конечная оптимизация*

[00339] Наиболее многообещающие замены для созревания сродства и стабилизация дисульфидной связи были объединены в клоне XII (SEQ ID NO: 40), клоне XIII (SEQ ID NO: 41) и клоне XIV. XIV (SEQ ID NO: 42).

10 [00340] Термическую стабильность и сродство с C3 и C3b человека определяют с помощью анализов DSF и SPR. Клон XII, клон XIII и клон XIV показали температуры плавления 70,4 °C, 67,7 °C и 67,2 °C, соответственно. Сродство связывания с человеческими C3 и C3b составляло 4,7 нМ и 4,8 нМ для  
15 клона XII, 116 рМ и 110 рМ для клона XIII, и 129 рМ и 116 рМ для клона XIV, соответственно.

[00341] Клон XII, клон XIII и клон XIV также проверяют на их активность в анализе ингибирования комплемента. Значения IC50 для ингибирования комплемента классическим путем составляли 0,098 мкМ, 0,06 мкМ и 0,05 мкМ для клона XII, клона XIII и клона XIV, соответственно, в то время как  
20 родительский клон IV демонстрировал IC50 0,08 мкМ. Значения IC50 для ингибирования комплемента в альтернативном пути составляли 0,21 мкМ, 0,26 мкМ и 0,25 мкМ для клона XII, клона XIII и клона XIV, соответственно, тогда

как для клона IV составляла IC50 0,28 мкМ. В совокупности клон XIII и клон XIV показали превосходные функциональные свойства, чем клон IV. Кроме того, клон XIII и клон XIV сравнивали в исследовании стабильности в зависимости от концентрации. Клон XIII можно было сконцентрировать до 150 мг/мл без потери содержания мономеров и только с потерей 2,2 % после 2 недель инкубации при 37 °С, в то время как клон XIV уже терял 1,6 % содержания мономеров при концентрации до 50 мг/мл и дополнительные 2,3 % после 2-недельной инкубации при 37 °С.

[00342] Последовательности клона XII, клона XIII и клона XIV приведены в следующей таблице 12.

[00343] Таблица 12:

Название	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
Клон XII	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTI DWYQQQPEKCPRYLMQLKSEGSYTKGTGVPDR FSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYYCGTDYGGG YVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SQVQVVESGGGSVQPGRSLRLSCAVSGFSLYNY AMNWVRQAPGKGLEWIGIINVGGGTNYASWA KGRFTISTDNSKNTVYLQMNSLRAEDTASYICA RAVGYHHARLDPWGCGTSVTVSS	40
Клон XIII	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTI DWYQQQPEKCPRYLMQLKSEGSYTKGTGVPDR FSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYYCGTEGVGG YVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SQVQVVESGGGSVQPGRSLRLSCAVSGFSLYNY AMNWVRQAPGKGLEWIGIINVGGGTNYASWA KGRFTISTDNSKNTVYLQMNSLRAEDTASYICA RAVGYHHARLDPWGCGTSVTVSS	41
Клон XIV	MQLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSAHKTYTI DWYQQQPEKCPRYLMQLKSEGSYTKGTGVPDR FSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYYCGTEGVGG YVFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SQVQVVESGGGSVQPGRSLRLSCAVSGFSLYNY AMNWVRQAPGKGLEWIGIINVGGGTNYASWA KGRFTISTDNSKNTVYLQMNSLRAEDTASYICA RAVGYHHSRLDPWGCGTSVTVSS	42

[00344] Окончательная гуманизация: прогнозирование риска иммуногенности с помощью EpiVax выявляет промежуточный риск для клона X (родительской конструкции клона XIII). Оценки EpiVax -39,36 и 14,86 были определены для VH и VL, соответственно. Кроме того, клон XI показал

идентичность последовательностей зародышевой линии человека на 77 % для VH и на 87 % для VL.

5 [00345] Эволюция клона IX в клон XIII включала исключительно модификации цикла CDR, поэтому обязательства, определенные в FR клона XI, остались неизменными в клоне XIII. Таким образом, выполняется дополнительная зародышевая линия в каркасных областях.

10 [00346] Кроме того, анализ *in silico* позволяет идентифицировать остатки, редко встречающиеся в репертуаре человеческих антител и, таким образом, несущие в себе повышенный риск иммуногенности. Соответственно, для дальнейшего снижения риска иммуногенности в кандидаты были включены следующие мутации VH S61D, W62S, A63V и Y30S, а также VL T56S.

15 [00347] В ходе заключительной кампании по гуманизации и оптимизации изобретатели создали клон III, который был лишен критических мотивов посттрансляционной модификации (ПТМ), подвергся дальнейшей гуманизации (идентичность человеческих последовательностей 86 % и 89 % для VL и VH соответственно) и дозреванию сродства.

20 [00348] Кроме того, был исследован мотив изомеризации (DG) на CDR L2, поскольку он оказал большое влияние на выход рефолдинга и сродства. Поэтому клон III был модифицирован путем введения мутации E50D, в результате чего появился клон II. Клон II показал идентичность последовательностей человека на 87 % и 89 % для VL и VH соответственно.

25 [00349] Дополнительный вариант клона II был создан путем замены всей CDR H2 на полностью человеческую последовательность зародышевой линии (увеличивая идентичность человеческой последовательности с человеческой зародышевой линией на дополнительные 7 % в VH), таким образом создавая клон I.

30 [00350] Таким образом, авторы изобретения гарантировали, что антитела против С3 в соответствии с изобретением не имеют предрасположенности, потенциально вызывающей изомеризацию, дезамидирование и окисление. Они также подтвердили, что антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с изобретением обладают приемлемой вязкостью, высокой стабильностью при хранении, высоким сродством с С3, С3b, демонстрируют одинаковую эффективность в классическом, альтернативном и



лектиновом пути, демонстрируют диффузию через мембрану Бруха свиньи и не обнаруживают значительной активации Т-клеток.

[00351] Типичные антитела в соответствии с изобретением включают в себя:

- 5           - Клон I: содержащий переменную тяжелую цепь SEQ ID NO: 20 и переменную легкую цепь SEQ ID NO: 21;
- Клон II: содержащий переменную тяжелую цепь SEQ ID NO: 22 и переменную легкую цепь SEQ ID NO: 23; и
- Клон III: содержащий переменную тяжелую цепь SEQ ID NO: 24 и
- 10          переменную легкую цепь SEQ ID NO: 25.

[00352] Иммуногенность

[00353] Авторы изобретения дополнительно оценили иммуногенность scFv в соответствии с изобретением. Изобретатели оценили прогнозируемую иммуногенность типичных антител в соответствии с изобретением: клон I, клон

15          II и клон III.

[00354] С этой целью изобретатели использовали инструмент *in silico* для прогнозирования таких эпитопов Т-клеток (EpiMatrix, разработанный в EpiVax).

[00355] Путем скрининга последовательностей многих изолятов человеческих антител компания EpiVax идентифицировала несколько

20          высококонсервативных лигандов HLA, которые, как полагают, обладают регуляторным потенциалом. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что многие из этих пептидов активно толерогенны у большинства субъектов. Эти высококонсервативные, регуляторные и беспорядочные эпитопы Т-клеток известны как трегитопы (De Groot и соавт. Blood. 2008 окт. 15;112(8):3303-11).

25          Иммуногенный потенциал неэпитопов, содержащихся в гуманизированных антителах, можно эффективно контролировать в присутствии значительного количества трегитопов.

[00356] Для целей анализа иммуногенности антител EpiVax включает шкалу EpiMatrix, скорректированную по трегитопу, и соответствующий прогноз

30          антитерапевтического ответа антител. Для расчета шкалы EpiMatrix, скорректированной по трегитопам, оценки трегитопов вычитаются из оценки белка EpiMatrix. Было показано, что баллы, скорректированные по трегитопу, хорошо коррелируют с наблюдаемым клиническим иммунным ответом на набор

из 23 коммерческих антител (De Groot и соавт. Clin Immunol. 2009 May;131(2):189-201).

[00357] Результаты по шкале EpiMatrix сведены в следующую таблицу 13.

[00358] Таблица 13:

Молекула	VH Идентичность последовательности зародышевой линии человека [%]	EpiVax (VH)	EpiVax (VL)	VL Идентичность последовательности зародышевой линии человека [%]
Клон I	96	-55	8	87
Клон II	92	-66	8	87
Клон III	88	-66	19	86
Беову	80	-66	32	88
Луцентис	76	-49	14	87
Авастин	77	-37	-25	88
Лампализумаб	89	-32	-14	78
Эйлеа	na	na	-16	na

5

[00359] Последовательности антитела в соответствии с изобретением оценивают по нижнему пределу шкалы EpiMatrix, что указывает на то, что scFv в соответствии с изобретением имеет сильно ограниченный потенциал иммуногенности. Указанная шкала EpiMatrix хорошо известна специалисту в данной области и может быть найдена, среди прочего, на фигуре 2 публикации Mufarrege и соавт. Clin Immunol., 2017 Mar;176:31-41.

10

[00360] Пример 5: Создание сравнительных соединений

[00361] A. Суррогат APL-1 и суррогат APL-2

15

[00362] В целях сравнения изобретатели разработали несколько производных компстатина, а именно:

- суррогат APL-1: ПЭГилированное производное монокомстатина (обозначенное в дальнейшем как «сравнительное соединение A1» или «соединение A1»)

20

- суррогат APL-2: ПЭГилированное димеризованное производное компстатина (обозначенное в дальнейшем как «сравнительное соединение A2» или «Соединение A2»).

[00363] Эти соединения описаны как APL-1 и APL-2 в заявке на патент US 20200282012A1. Они дополнительно раскрыты в:

- Ricklin D, Lambris JD. Compstatin: a complement inhibitor on its way to clinical application. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 632:273-292. doi:10.1007/978-0-387-78952-1\_20 и

- Mastellos DC, Ricklin D, Lambris JD. Clinical promise of next-generation complement therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(9):707-729. doi:10.1038/s41573-019-0031-6.

Соединение А1 представляет собой циклический пептид против С3, полученный из компстатина. Соединение А2 было дополнительно разработано на основе соединения А1 для продления периода его полувыведения из крови и улучшения его растворимости в сыворотке. Соединение А2 содержит два пептидных фрагмента, связанных посредством линейного линкера ПЭГ массой 40 кДа.

[00364] Последовательности соединения А1 и соединения А2 приведены в следующей таблице 14.

15 [00365] Таблица 14:

Название	Аминокислотная последовательность	Основная последовательность	Комментарии
Соединение А1	Ac-I-[CV-Trp(Me)-QDWGAHRC]-T-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO: 49)	ICVWQDWGAHRC (SEQ ID NO: 49)	Соединение А1 ацетируется на С-конце  Триптофан в положении 4 представляет собой 1-метилтриптофан  Скобки указывают на циклизацию пептида по остаткам Cys
Соединение А2	Gly-I-[CV-Trp(Me)-QDWGAHRC]-T-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO: 50)	GICVWQDWGAHRC (SEQ ID NO: 50)	Триптофан в положении 4 представляет собой 1-метилтриптофан  Скобки указывают на циклизацию пептида по остаткам Cys  Соединение димеризуется через NHS-PEG40-NHS

[00366] Дополнительные данные относительно структуры и последовательности соединения А1 и соединения А2 доступны в *Adv Exp Med Biol.* 2008; 632: 273–292.

[00367] В. Суррогат NGM621

[00368] В целях сравнения авторы изобретения разработали соединение NGM, как описано в WO 2019195136A1. Это соединение NGM предпочтительно представляет собой суррогат NGM621, называемый в дальнейшем «сравнительным соединением А3» или «соединением А3». Указанное  
5 соединение А3 представляет собой IgG против С3 со следующими свойствами.

[00369] Соответствующие последовательности приведены следующим образом в следующей таблице 15.

[00370] Таблица 15:

Название	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
Соединение А3 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYMDWVR QAPGQRLEWMGYIYPHNGGTTYNQFTGRVTITVDKSAS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGGFDYWGQGLVTV SS	51
Соединение А3 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASENVDITYVSWYQQK PGKAPKLLIYGASNRVTGVPFRFSGSGSDTFTFTISLQP EDIATYHCGQSHSYPLTFGQGTKLEIKR	52
Соединение А3 HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYMDWVR QAPGQRLEWMGYIYPHNGGTTYNQFTGRVTITVDKSAS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGGFDYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL GGPSVFLFPPPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	53
Соединение А3 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASENVDITYVSWYQQK PGKAPKLLIYGASNRVTGVPFRFSGSGSDTFTFTISLQP EDIATYHCGQSHSYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSITYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	54

10

[00371] Изобретатели дополнительно разработали суррогат NGM621 в формате Fab на основе вышеупомянутой последовательности. Указанное соединение обозначается как «соединение А3 Fab».

[00372] Пример 6: Сравнительные данные

15

[00373] А. Другой механизм действия

[00374] Примерное антитело в соответствии с изобретением и сравнительные соединения имеют различные механизмы действия и отличительные особенности, которые кратко изложены ниже:

- антитело в соответствии с изобретением ингибирует C3 и C3b,
- APL-2 ингибирует C3 и C3b,
- NGM621 ингибирует C3 и
- ZIMURA® ингибирует C5.

5 [00375] Авторы изобретения показали, что в отличие от NGM621 примерное антитело в соответствии с изобретением клон I связывается с C3 и C3b с одинаковой сродством, как показано в следующей таблице 16.

[00376] Таблица 16:

	Примерное антитело в соответствии с изобретением (Клон I)	NGM621*
C3 (Kd, нМ)	0,16	0,34
C3b (Kd, нМ)	0,14	> 34

10 \*данные Alexander Loktev и соавт. «*NGM621 is a potent inhibitory anti-complement C3 antibody in development for treatment of geographic atrophy*» ARVO 2020 Meeting, Poster B0267.

[00377] В. *Формат ScFv может доставлять больше молекул лекарственного средства за одну IVT инъекцию*

15 [00378] Авторы изобретения установили массовую массу, объем инъекции и потенциальные дозы типичного антитела в соответствии с изобретением и сравнительного соединения A2, сравнительного соединения A3 и ZIMURA® (данные доступны в литературных источниках), как показано в нижеследующей таблице 17.

20 [00379] Таблица 17:

	Примерное антитело в соответствии с изобретением (клон I)		APL-2	Сравнительное соединение A3	ZIMURA®**
Мм (кДа)	26		43	150	54
Объем инъекции (мкл)	50	100	100	100	100
Доза (мг)	7.5	15	15	15	2
Доза (нмоль)	287	574	347	100	37

[00380] Антитело в соответствии с изобретением обеспечивает более высокое количество лекарственного средства на IVT, введенное в глаз, способствуя достижению большего ингибирования комплемента в глазу.

5 [00381] *С. Формат ScFv обеспечивает лучшее проникновение в сетчатку после эквимольной интравитреальной инъекции по сравнению с Fab или IgG.*

10 [00382] Авторы изобретения сравнили проникновение в сетчатку scFv (бролюцизумаб) и Fab (ранибизумаб) после эквимольной интравитреальной инъекции яванским макакам. Данные показывают, что формат scFv обеспечивает лучшее проникновение в сетчатку по сравнению с Fab или IgG. Таким образом, ожидается, что антитела в соответствии с изобретением в формате scFv достигнут более высоких уровней воздействия на сетчатку по сравнению с Fab при интравитреальном введении (фигура 1A и 1B).

15 [00383] Пример 7: Эффективность и активность *in vitro* scFv в соответствии с изобретением и сравнение со сравнительным соединением A1 и сравнительным соединением A3

[00384] Для определения функциональной активности и сравнения типичных scFv в соответствии с изобретением проводят следующий анализ: анализ ингибирования комплемента, измеряющий выработку мембраноатакующего комплекса, и гемолитический анализ.

20 [00385] *А. Материалы и способы*

*а. Анализ ингибирования комплемента*

25 [00386] Для мониторинга ингибирования системы комплемента в сыворотке человека scFv в соответствии с изобретением или молекулы сравнения тестируют с использованием иммуноферментного анализа для качественного определения функциональных классических, лектиновых и альтернативных путей комплемента в сыворотке человека с использованием скрининга системы комплемента WEISLAB® Complement system Screen (Svar Life Science AB, Мальмё, Швеция), следуя инструкциям поставщика. Количество образующегося неоантигена C5b-C9 является пропорциональным функциональной активности путей комплемента. scFv в соответствии с изобретением и молекулы сравнения  
30 тестируют по кривой реакции концентрации, и IC50 для ингибирования рассчитывают с использованием программного обеспечения GraphPadPrism и нелинейной регрессионной кривой с 4 параметрами.

*б. Гемолитический анализ*

[00387] Фрагменты антитела против С3 оценивают на предмет их способности ингибировать гемолиз сенсibilизированных антителами эритроцитов овцы, опосредованный активацией классического пути (СР) или альтернативного пути (АР) в сыворотке человека. Для этого поверхность эритроцитов овцы покрывают гемолизином (кроличьи анти-овечьи антитела) для активации системы комплемента в сыворотке человека, что приводит к активации С3 и последующему образованию мембранатакующего комплекса (МАС). МАС собирается на мембране эритроцитов овцы, что приводит к лизису клеток. Уровень гемоглобина, высвободившегося из лизированных эритроцитов, измеряется при OD 414 нм и пропорционален активности комплемента, присутствующей в образце сыворотки. Для определения способности молекул антитела против С3 ингибировать активность СР, сыворотку человека разводили в буфере GVB++ (технология комплемента) для оптимальной активации классического пути (требуются ионы кальция и магния). Из этого раствора готовят серийные разведения тестируемых образцов антитела против С3 с конечной концентрацией 1 % человеческой сыворотки для каждой точки данных (до добавления к эритроцитам). Образцы инкубируют с сенсibilизированными антителами эритроцитами овцы в течение 1 часа при 37 °С и измеряют высвободившийся гемоглобин в супернатанте после стадии центрифугирования.

[00388] Альтернативный путь (АР) в образцах сыворотки человека спонтанно активируется эритроцитами кролика. Поскольку для активации АР требуются более высокие концентрации сыворотки, классический путь необходимо блокировать с помощью MgEGTA для хелатирования ионов Ca<sup>2+</sup> (АР требует только ионы Mg<sup>2+</sup>). Активация АР приводит к активации С3 и последующему формированию мембраноатакующего комплекса (МАС). МАС собирается на мембране эритроцитов кролика, что приводит к лизису клеток. Уровень гемоглобина, высвободившегося из лизированных эритроцитов, измеряется при OD 414 нм и пропорционален активности комплемента, присутствующей в образце сыворотки.

[00389] В. Результаты

[00390] Результаты приведены в нижеследующей таблице 18.

[00391] Таблица 18:

IC50 (нМ)		Клон I	Клон II	Клон III	Соединение A1	Соединение A3
Классический путь	Отложение MAC	79	77	73	402	56
	Гемолиз	74	69	72	709	56
Альтернативный путь	Отложение MAC	344	360	349	333	548
	Гемолиз	705	668	745	2535	207
Лектиновый путь	Отложение MAC	67	71	64	222	58

[00392] Примерные антитела в соответствии с изобретением (клон I, клон II и клон III) более эффективны, чем соединение A1 (активный компонент соединения A2). Важно отметить, что изобретатели показали, что примерные антитела в соответствии с изобретением ингибируют классический и лектиновый пути более эффективно по сравнению с соединением A1.

[00393] Клон I демонстрирует аналогичную активность на альтернативном пути, таком как соединение A1.

10 [00394] Клон I показывает более сильное ингибирование классического пути по сравнению с соединением A1.

[00395] Клон I показывает более сильное ингибирование лектинового пути по сравнению с соединением A1.

15 [00396] Клон I: Авторы изобретения показали, что примерное антитело в соответствии с изобретением (клон I) ингибирует все эффекторные функции комплемента с высоким сродством и эффективностью.

20 [00397] Соединение A1: Авторы изобретения показали, что сравнительное соединение A1 ингибирует все эффекторные функции комплемента, с высоким сродством и эффективностью, по сравнению с антителами в соответствии с изобретением.

[00398] NGM621: Авторы изобретения показали, что суррогат NGM621, сравнительное соединение A3 не проявляет ингибирования C3b.

[00399] ZIMURA®: Соединение ZIMURA® нацелено только на C5.



[00400] Пример 8: Средство связывания с человеческими C3 и C3b и сравнение средства связывания антитела в соответствии с изобретением, сравнительного соединения A1 и сравнительного соединения A3

5 [00401] Авторы изобретения оценили средство связывания примерного scFv в соответствии с изобретением с человеческим C3, а также средство связывания соединения A1 и соединения A3 с человеческими C3 и C3b.

[00402] *А. Материалы и методы*

10 [00403] Кинетические параметры кандидатов определяются с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР) и прибора Biacore T100. C3 и его различные варианты (таблица 19) иммобилизуют в качестве лиганда на сенсорном чипе SPR HC30M (XanTec bionalytics, Германия) с использованием химического связывания EDC/сульфо-NHS. Пять возрастающих концентраций каждой молекулы (аналита) вводят последовательно с использованием режима одноциклового кинетики (SCK) для определения кинетических параметров.  
15 Регенерацию между кандидатами осуществляют с помощью 10 mM глицина\*HCl, 2 M NaCl, pH 3,5. Данные соответствуют модели связывания Ленгмюра 1:1, и были определены кинетические параметры скорости включения ( $k_a$ ), скорости отключения ( $k_d$ ) и средства ( $K_D$ ).

20 [00404] Однонуклеотидный полиморфизм (SNP) наблюдали во всей популяции, и некоторые SNP были идентифицированы в полногеномных исследованиях ассоциаций (GWAS), которые коррелируют с повышенным риском развития ВДЖП. Общие варианты SNP включают в себя P314L, который встречается примерно у 23,3 % населения, и R102G, который, как сообщают, встречается примерно у 26-29 % населения. Очень редкие варианты, которые  
25 встречаются менее чем у 2,5 % населения, включают в себя K155Q, R735W, S1619W, K65Q и R161W.

[00405] Поэтому авторы изобретения измерили средство связывания scFv в соответствии с изобретением с наиболее часто встречающимися формами C3, т. е., R102G и P314L. Человеческий C3 дикого типа, человеческий C3 P314L и  
30 человеческий C3 R102G экспрессируются в клеточной линии CHO с использованием набора ExpiFectamine CHO Expression Kit (Thermo Fisher Scientific). Белки экспрессируют с помощью N-концевой метки 6xHis и очищают с использованием колонки HisTrap Excel HP (GE Healthcare) с последующей

стадией эксклюзионной хроматографии (SUPERDEX®20010/300GL; GE Healthcare).

[00406] *В. Результаты*

5 [00407] Данные о кинетике и сродству scFv в соответствии с изобретением, соединения А1 (активного компонента соединения А2) и соединения А3, связывающихся с человеческими С3 и С3b соответственно, перечислены в следующей таблице 19.

[00408] Таблица 19:

IC50 (нМ)	Клон I	Клон II	Клон III	Соединение А1	Соединение А3 Fab
Сродство человеческого С3 (нМ)	0.152	0.022	0.151	6,2	0,34
Сродство человеческого С3b (нМ)	0.149	0.05	0.127	8,6	> 34

10 [00409] Соединение А3 связывает С3 с высоким сродством с интактным человеческим С3 ( $K_D=0,34$  нМ), но демонстрирует значительно более низкое сродство (> 100-кратное) к С3 фрагментам расщепления С3b.

15 [00410] Напротив, примерное антитело в соответствии с изобретением связывает С3 с более высоким сродством, чем соединение А3. Кроме того, примерное антитело в соответствии с изобретением имеет приблизительно эквивалентное сродство связывания с С3 и С3b.

20 [00411] Примечательно, что антитела в соответствии с изобретением связываются с человеческими С3 и С3b с более высоким сродством по сравнению с соединением А1 и соединением А3, что обеспечивает более сильное ингибирование С3. По сравнению с соединением А3 предлагаемые в изобретении антитела связываются с более высоким сродством к С3b и, следовательно, блокируют образование С3b в петле амплификации С3, а также активность уже депонированных С3b и С3b, генерируемых альтернативными путями активации.

25 [00412] Дополнительные результаты суммированы в следующей таблице 20.

[00413] Таблица 20:

Молекула		С3	С3b	супо С3	рекомбинантный С3	С3 SNP1 P314L	С3 SNP2 R102G
Клон II	$K_D$ (нМ)	0.022	0.05	0.07	0.035	<0.04*	0.021
	$k_a$ ( $\times 10^5$ )	2.5	2.5	2.1	3	2.9	3.3

	$M^{-1}c^{-1}$						
	$k_d (x 10^{-6} c^{-1})$	5.5	12	15	10	<11	7
Клон I	$K_D$ (нМ)	0.152	0.149	0.267	0.148	0.14	0.135
	$k_a (x 10^5 M^{-1}c^{-1})$	3.1	3.2	2.4	3.3	3	3.3
	$k_d (x 10^{-6} c^{-1})$	47	48	63	49	42	45
Клон III	$K_D$ (нМ)	0.151	0.127	0.208	0.128	0.127	0.115
	$k_a (x 10^5 M^{-1}c^{-1})$	2.4	2.5	2	2.7	2.5	2.8
	$k_d (x 10^{-6} c^{-1})$	36	31	43	35	32	32
Соединение A1	$K_D$ (нМ)	6.2	8.6	н.о.	12.9	13.7	н.о.
	$k_a (x 10^5 M^{-1}c^{-1})$	8.8	10.7		4.99	4.47	
	$k_d (x 10^{-6} c^{-1})$	5470.9	9202.7		6444.4	6139.1	

[00414] Таким образом, авторы изобретения подтвердили, что антитела в соответствии с изобретением, включая клон I, клон II и клон III, обладают более высоким сродством к C3 и C3b и ингибируют активацию комплемента на 2/3 более эффективно, чем соединение A1.

[00415] Высокое сродство связывания примерных антител способствует продлению времени нейтрализации C3 после интравитреальной инъекции и дополнительно позволяет снизить частоту инъекций. Улучшенное сродство связывания и снижение частоты инъекций значительно повышают эффективность лечения пациентов. Это также обеспечивает ценные преимущества для пациента, особенно улучшение соблюдения режима приема лекарственных средств.

[00416] Кроме того, следует отметить, что scFv в соответствии с изобретением связывается с C3 дикого типа, а также с релевантным для заболевания SNP C3 P314L с более высоким сродством, чем соединение A1.

[00417] Пример 9: Идентификация антителосвязывающего эпитопа на человеческом комплементе C3

[00418] Получение белка: компонент комплемента C3c представляет собой основной фрагмент, образующийся в результате расщепления C3 конвертазой C3 и фактором I. C3c, выделенный из плазмы человека, приобретен у компании Athens Research & Technology (номер продукта 16-16-030303), дегликозилирован посредством PNGазы F и очищен с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке SUPERDEX® 200. Пиковые фракции объединяют, концентрируют с

использованием фильтрующего устройства Amicon с отсечкой 50 кДа и хранят при -80 °С.

5 [00419] Кристаллизация scFv: Кристаллы получают методом диффузии паров висячей капли путем смешивания 0,1 мкл белка с 0,1 мкл резервуарного раствора, содержащего 0,1 М ацетата аммония, 0,1 М хлорида цинка, 0,1 М BIS-TRIS pH 6,0 и 15 % мас./об. PEG Smear High. Кристаллы пластинчатой формы появляются в течение суток. Кристаллы подвергают криозащите с помощью резервуарного раствора, дополненного посредством 30 % об./об. глицерина, и быстро замораживают в жидком азоте.

10 [00420] Сбор данных и определение структуры: Данные собирают при 100 К на канале X10SA от SLS в Виллигене, Швейцария. На детекторе EIGER X 16M собирают 3600 кадров по 0,1° на кадр. Данные обрабатывают с помощью autoPROC. Модель молекулярной замены создается с помощью SCULPTOR в пакете программного обеспечения PHENIX с использованием ранее  
15 определенной рентгеновской структуры аналогичного scFv в качестве матрицы. Молекулярную замену выполняют с помощью PHASER с использованием модели scFv, приготовленной с использованием SCULPTOR в качестве матрицы. Структура уточняется с помощью Buster, построение модели и анализ методом наименьших квадратов выполняют с помощью COOT.

20 [00421] Подготовка образцов Cryo-EM и сбор данных: С3с смешивают с ScFv в соотношении 1:1,2, инкубируют в течение 16 ч. при 277 К и очищают на увеличивающей колонке SUPERDEX® 200. Пиковую фракцию концентрируют до 36 мкМ и наносят на EM-сетку (Quantifoil-1,2/1,3 Au 300). Сетки cryo-EM готовят с использованием Leica GP (Leica Microsystems). Сетки промокают в  
25 течение 2 с при 4 °С и влажности 85 %, и погружают в жидкий этан, охлаждаемый жидким азотом. Криосетки просматривают на микроскопе Glacios, работающем при напряжении 200 кВ, с детектором Falcon III, а сетки хорошего качества переносят на микроскоп Titan Krios, работающий при 300 кВ. Изображения собирают в режиме сверхвысокого разрешения с использованием  
30 детектора Falcon IV (Thermo Fisher Scientific), установленного после энергетического фильтра с калиброванным размером пикселя 0,745 Å на пиксель. Микрофотографии подвергаются суммарной дозе 60 e<sup>-</sup>/Å<sup>2</sup> и обрабатываются с использованием CryoSPARC v3.1.1. Стеки корректируются по

движению и объединяются в два раза, в результате чего размер пикселя составляет 1,49 Å на пиксель.

[00422] Анализ изображений Cryo-EM: всего 1 914 120 частиц выбрано с помощью средства выбора шаблонов CryoSPARC из 3622 микрофотографий. 5 Выбранные частицы извлекаются с размером поля 348 пикселей и группируются до 174 пикселей в CryoSPARC. Извлеченные частицы затем подвергаются 3-м раундам 2D-классификации в CryoSPARC-3.1.1. для удаления льда, загрязнений и агрегатов, получив 421 628 частиц. Классы с четко определенной плотностью C3c-scFv используются для *ab initio* реконструкции в cryoSPARC-3.1.0. 10 245 993 частицы выбирают на основе порогового значения 2D-класса, равного 0,9, и подвергаются одному раунду равномерного и неравномерного уточнения. Частицы повторно извлекаются с размером поля 348 пикселей и выполняются еще два раунда равномерного и неравномерного уточнения. Это привело к разрешению оболочки Фурье 2.55 Å.

[00423] Построение модели: Рентгеновские структуры C3c (pdb 5FOB) и scFv встроены в EM плотность с помощью CHIMERA, уточнены в реальном пространстве с помощью PHENIX и проверены с помощью COOT. Анализ интерфейса выполняется с помощью PYMOL.

[00424] Структура клона I определена методом рентгеновской кристаллографии с разрешением 1,4 Å. Структурированный содержит две молекулы на асимметричную единицу. Все остатки были четко определены на карте электронной плотности, за исключением остатков: двух N-концевых остатков в цепях A и B, линкерных остатков 115-132 в цепи A и 114-133 в цепи B и C-концевого остатка 253 в цепи B.

[00425] Из-за предпочтительной ориентации сложных молекул на EM-сетках, разрешение было ограничено до 4-5 Å на границе раздела между C3c и scFv, что по-прежнему позволяет размещать модели, полученные с помощью рентгеновских лучей, на EM карте. Остатки в пределах 6 Å от scFv определяли как остатки сайта связывания, которые соответствуют аминокислотам 366,392-30 396,413-421,425,427,442,453,478 человеческого компонента C3 (SEQ ID NO: 47). Результаты показали, что клон I связывается с эпитопом, частично перекрывающимся с сайтом связывания компстатина, но не ограничиваясь им. Повышенное сродство связывания с C3, проявляемое молекулой в соответствии с настоящим изобретением по сравнению с производными компстатина,

вероятно, является результатом этой расширенной границы связывания. Эти результаты показывают, что молекула в соответствии с настоящим изобретением связывается с С3 другим способом по сравнению с ингибиторами С3 предшествующего уровня техники, что, вероятно, способствует ее уникальной способности ингибировать все три пути комплемента, включая классический путь (СР), лектиновый путь (LP) и альтернативный путь (AP).

[00426] Пример 10: *In vitro* анализ просачивания ВгМ и проницаемости ВгМ

[00427] Мембрана Бруха образует самый внутренний слой сосудистой оболочки, и считается, что структурные изменения вызывают активацию комплемента у пациентов с ГА. Поскольку разрушение хориокапилляров, вызванное комплементом, играет важную роль в патофизиологии ГА, отличная диффузия через мембрану Бруха является важной особенностью ингибитора комплемента для лечения этого заболевания.

[00428] Поэтому авторы изобретения оценили способность scFv в соответствии с изобретением диффундировать через мембрану Бруха *in vitro* и сравнили ее с соединением А2 и соединением А3.

[00429] *А. Материалы и методы*

[00430] Для этого измерения используют образцы мембран Бруха свиньи. Глаза свиней собирают на бойне не более чем через 6 часов после забоя животных и хранят при температуре 4 °С до использования (в тот же день).

[00431] *Получение обогащенной мембраны Бруха (BrM):* глаза помещают в одноразовую чашку Петри и удаляют остатки ткани, окружающей глазное яблоко. Глазное яблоко надрезают скальпелем рядом с радужной оболочкой и из наглазника удаляют переднюю часть глаза, а также хрусталик, стекловидное тело и ткань сетчатки. Обогащенную мембрану Бруха, включая покрывающий ее монослой ПЭС, осторожно снимают со всей внутренней поверхности наглазника, помещают в чашку Петри, наполненную PBS, и осторожно расплющивают в жидкости. После этого мембрану Бруха переносят в камеру Уссинга, камеру Уссинга закрывают и одно отделение наполняют 1 мл PBS для испытания на утечку. Если через 5 мин во втором отсеке не наблюдается значительного скопления жидкости, мембрану считают неповрежденной. Для каждой камеры Уссинга используют препарат Бруха из 4 разных глаз.

[00432] *Инкубация обогащенной мембраны Бруха с тестируемыми образцами:* готовят мастер-микс суррогата APL-2 (такого как соединение А2) и

scFv против C3s или суррогата APL-2 (такого как соединение A2) и суррогата NGM621 (такого как соединение A3) в PBS (+0,02 %  $\text{NaN}_3$  + смесь ингибиторов протеазы (полные таблетки, мини без EDTA, EASYpack; Roche)) в количестве, достаточном для 4 камер Уссинга (1 мл на камеру Уссинга) при конечной концентрации 0,1 мг/мл для каждого соединения. 1 мл мастермикса добавляют в одно отделение (обозначаемое камерой для проб) на каждую камеру Уссинга. Во второй отсек (обозначаемый камерой диффузата) на каждую камеру Уссинга добавляют 1 мл PBS (+0,02 %  $\text{NaN}_3$  + ингибиторы протеазы). Камеры Уссинга герметизируют парафильмом и инкубируют при комнатной температуре, осторожно встряхивая для облегчения диффузии.

[00433] *Отбор образцов и анализ целостности мембраны:* для отбора образцов в разные моменты времени (4 часа, 24 часа, 48 часов и 72 часа) раствор в отдельных отсеках смешивали путем осторожного пипетирования вверх и вниз, и 90 мкл переносили отдельно из каждого образца и камеры диффузата в пробирки для сбора. В конце инкубационного периода проводят тест на целостность мембраны с использованием Sphero Carboxyl Polystyrene Blue Particles: суспензию разбавляют 1:10 в PBS и добавляют 200 мкл в один отсек (обозначенный камерой для образцов) на камеру Уссинга и инкубируют в течение 30 мин. Наблюдают накопление синих частиц во втором отсеке и записывают изображения с камеры для контроля общей целостности мембраны. Анализ образца: по 15 мкл каждого раствора из камер для образца и диффузата эффективно загружают на 2 готовых полиакриламидных геля (гели NuPAGE Bis-Tris) вместе с таким же количеством хранимого мастермикса в качестве контроля загрузки. Первый гель анализируют с помощью стандартных методов SDS-PAGE и окрашивания на основе кумасси для обнаружения белка (scFv против C3). Второй гель анализируют с помощью электрофореза в SDS-PAGE и окрашивания йодидом бария для выявления ПЭГ (соединение A2).

[00434] *Оценка:* Фотографии SDS-гелей анализируют с помощью программного обеспечения ImageJ2 (Fiji). Полосы были определены количественно и представлены в виде % тестируемого соединения в соответствующей камере, где 100 % относятся к сумме интенсивностей полос образца и камеры диффузата в одном и том же устройстве Уссинга.

[00435] *В. Результаты*

[00436] Способность скрещивать свиную VgM сравнивали для scFv в соответствии с изобретением и производных компстатина, таких как соединение A2, которые одновременно инкубировали на препаратах VgM из четырех разных 5 глаз свиней. Значительно более высокие количества scFv пересекали VgM во всех четырех препаратах мембран по сравнению с суррогатом APL-2. Аналогично, способность скрещивать свиную VgM сравнивали для суррогата NGM621 (соединение A3) и суррогата APL-2 (соединение A2), которые одновременно инкубировали на препаратах VgM из четырех разных глаз свиней.

10 [00437] Примерное антитело в соответствии с изобретением (Клон I) продемонстрировало превосходную диффузионную способность через мембрану Бруха по сравнению с соединением A2 и соединением A3 (фигуры 3 и 4).

[00438] Соединение A2: проникновение отсутствует

15 [00439] Соединение A3: сниженное проникновение по сравнению с примерным антителом в соответствии с изобретением.

[00440] ZIMURA®: молекулу не тестировали. Поскольку она содержит тот же большой фрагмент ПЭГ массой 40 кДа, что и APL-2, ожидается аналогичное поведение.

20 [00441] Пример 11: Термическая стабильность белка scFv в соответствии с изобретением

[00442] *А. Материалы и способы*

[00443] *Используемые методики: ДСФ*

25 [00444] Дифференциальная сканирующая флуориметрия (ДСФ) измеряет разворачивание белка путем отслеживания изменений флуоресценции в зависимости от температуры.

[00445] Температура разворачивания белка ( $T_m$ ) связана со стабильностью антител, в частности с агрегацией при хранении и долговременной стабильностью терапевтического продукта. Термические переходы доменов СН2 и СН3 моноклональных антител обычно инвариантны для разных антител внутри 30 изотипа, при этом домен СН2 разворачивается раньше домена СН3.

[00446] *В. Результаты*

[00447] Результаты приведены в следующей таблице 21.



[00448] Таблица 21:

СОЕДИНЕНИЕ	КЛОН I	КЛОН II	КЛОН III
РАЗВЕРТЫВАНИЕ $T_m$ °C (ДСФ)	72,0 / 71,8	69,5 / 69,4	69,0 / 68,5

[00449] Высокое значение  $T_m$  означает, что при данной температуре в развернутом состоянии находится меньше молекул. Таким образом, высокое значение  $T_m$  выгодно для терапевтических белковых препаратов, поскольку высокое значение  $T_m$  поддерживает активную конформацию при физиологических температурах.

[00450] Эти результаты подтверждают превосходные фармацевтические свойства примерных антител в соответствии с изобретением. В частности, улучшенная термостабильность способствует повышению терапевтической эффективности, позволяя при этом снизить дозу и частоту инъекций пациентам. Кроме того, результаты свидетельствуют о более высоком сроке хранения и улучшенной стабильности терапевтического продукта во времени. Улучшенная стабильность и пролонгированная активность способствуют тому, что антитела в соответствии с изобретением хорошо адаптированы для интравитреального введения.

[00451] Пример 12: Риск иммуногенности: проверка на наличие ранее существовавшего ADA

[00452] Авторы изобретения проверяют сыворотку здоровых доноров-людей на наличие ранее существовавшего ADA против клона I, используя мостиковый ELISA. Ранее существовавшие ADA, присутствующие в сыворотке здоровых доноров-людей, связываются иммобилизованным scFv против C3. На следующем этапе ADAs связываются с тем же scFv против C3, меченным биотином, и обнаруживаются с помощью HRP-конъюгированного стрептавидина.

[00453] *А. Материалы и методы*

[00454] scFv метят биотином с использованием набора «Biotin Conjugation Kit (Fast, Type A) - Lightning-Link» (Expedeon/Abcam) в соответствии с инструкциями поставщиков. Немеченый scFv разбавляют до концентрации 0,5 мкг/мл в PBS, 50 мкл на лунку переносят в 96-луночный планшет и инкубируют в течение ночи при 4 °C. На следующий день 96-луночный планшет промывают промывочным буфером (3x 320 мкл, 0,05 % Tween 20 в PBS pH 7,4) и сайты

неспецифического связывания блокируют посредством 300 мкл/лунку блокирующего буфера (SuperBlock Blocking Buffer; ThermoFisher scientific) в течение 30 мин. при комнатной температуре. Затем лунки промывают промывочным буфером (3x 320 мкл/лунку).

5 [00455] Человеческую сыворотку здоровых добровольцев разбавляют до 10 % в PBS, добавляют 50 мкл/лунку в 96-луночный планшет и планшет инкубируют в течение 1 ч. при комнатной температуре. Затем планшет промывают промывочным буфером (3x320 мкл/лунку), добавляют 50 мкл/лунку биотинилированного scFv (0,05 мкг/мл в PBS) на лунку и инкубируют в течение  
10 1 ч. при комнатной температуре.

[00456] Планшет промывают (3x320 мкл/лунку промывочного буфера), добавляют 50 мкл/лунку Streptavidin-PolyHRP40 (SDT Reagenst; 1:5000 в PBS) и инкубируют в течение 30 мин. при комнатной температуре.

[00457] Планшет промывают (3x320 мкл/лунку промывочного буфера),  
15 добавляют 50 мкл/лунку субстрата TMB (Invitrogen) инкубируют в течение 5 мин. при комнатной температуре. Затем реакцию останавливают добавлением 50 мкл/лунку 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Поглощение измеряют при 450 нм. Ранее существовавшая ADA приведет к увеличению абсорбции.

[00458] *В. Результаты*

20 [00459] Для клон I ранее существовавшая ADA была обнаружена в 9 из 50 образцов сыворотки, что свидетельствует об общем низком риске иммуногенности. Эти результаты подтверждают, что антитела в соответствии с изобретением весьма пригодны и являются многообещающими для лечения глазных заболеваний с низким риском иммуногенности.

25 [00460] Пример 13: Биофизическая характеристика антител в соответствии с изобретением в высококонцентрированных составах

[00461] *Стабильность при хранении*

[00462] Клон I, клон II и клон III тестируют на стабильность при хранении. Образцы концентрируют до 150 мг/мл (центрибежное устройство Vivaspin20, 5  
30 кДа MWCO при 3800 x g) и хранят при 25 °C и 40 °C до 4 недель. Образцы анализируют на олигомеризацию (SE-HPLC) и химическую деградацию (IEC-HPLC). Соответствующее снижение содержания мономеров по сравнению с исходным значением указано в таблице 22. Начальная чистота мономеров, определенная с помощью SE-HPLC составляла 99,96 % для каждого клон.

Чистота исходной загрузки, определенная с помощью IEX-HPLC составляла 98,07 %, 97,16 % и 96,76 %, соответственно для клонов I, II и III.

5 [00463] Клон I, Клон II и Клон III продемонстрировали превосходную стабильность мономеров и заряда при 25 °C и 40 °C в течение 4-недельного периода инкубации.

[00464] *Вязкость при высоких концентрациях*

10 [00465] Усилие инъекции, необходимое для введения препарата через стандартную интравитреальную иглу, зависит от вязкости продукта и должно быть достаточно низким, чтобы врач мог безопасно ввести препарат. Поэтому, требуются низкие вязкости, обычно ниже 15 мПа·с при 20 °C в полностью

15 [00466] Измерения вязкости проводят на образцах, подготовленных для исследования стабильности при хранении. В дополнение к полностью подготовленным образцам (10 мМ His pH 5,5, 275 мМ сахарозы, 0,02 % мас./об. Polysorbate20), также измеряют вязкость каждого кандидата в минимальном составе (10 мМ гистидина, pH 5,5). Это осуществляют для оценки технологичности фармацевтической субстанции (например, фильтрации, перекачивания, диафильтрации и т. д.) кандидатов до 125 % от конечной концентрации лекарственного препарата 150 мг/мл.

20 [00467] Вязкость измеряют при 20 °C при скорости сдвига 1000 с<sup>-1</sup> с использованием реометра с конической пластиной. Вкратце, ступенчатое увеличение скорости сдвига до 1,000 с<sup>-1</sup> осуществляется при сборе 100 точек данных, после чего следует дальнейшее увеличение скорости сдвига до 2000 с<sup>-1</sup>, собирая еще 10 точек данных. Наконец, происходит ступенчатое снижение скорости сдвига до начальной. Полученные данные о вязкости представлены в

25 Таблице 22. Хорошие свойства при обращении с лекарственным средством при его наполнении и шприцевании наблюдали для всех кандидатов.

[00468] Свойства вязкости и стабильности клонов I, II и III, составленных при концентрации >150 мг/мл приведены в таблице 22.

30 [00469] Таблица 22

Кандидаты	Клон I	Клон II	Клон III	Состав
Вязкость [мПа·с]				
Минимальный буфер	5.4	4.5	3.2	10 мМ His pH 5,5
при 185 г/л	3.9	3.9	3.3	10 мМ His pH 5,5,
Полностью				275 мМ сахарозы,

Кандидаты	Клон I	Клон II	Клон III	Состав
приготовленный при 150 г/л				0,02 % мас./об. Polysorbate20
Стабильность при хранении, SEC 4 недели при 25 °C [D %] 4 недели при 40 °C [D %]	0.06 0.37	0.11 1.59	0.10 0.84	10 mM His pH 5,5, 150 mM NaCl
Стабильность при хранении, IEX 4 недели при 25 °C [D %] 4 недели при 40 °C [D %]	1.1 2.4	0.5 3.3	0.3 3.6	10 mM His pH 5,5, 150 mM NaCl

[00470] Авторы изобретения показали, что примерные антитела в соответствии с изобретением демонстрируют исключительную стабильность в высококонцентрированных составах.

ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент,  
содержащие переменную тяжелую цепь (VH) и переменную легкую цепь  
5 (VL),

– при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1,  
последовательность CDR-H2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2  
и 15, последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и

10 – при этом VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4,  
последовательность CDR-L2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5  
и 18, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6.

2. Антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1,

15 – при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1,  
последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 2, и последовательность CDR-H3 SEQ  
ID NO: 3; и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4,  
последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 5, и последовательность CDR-L3 SEQ  
ID NO: 6, или

20 – при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1,  
последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 15, и последовательность CDR-H3 SEQ  
ID NO: 3; и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4,  
последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 5, и последовательность CDR-L3 SEQ  
ID NO: 6, или

25 – при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1,  
последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 15, и последовательность CDR-H3 SEQ  
ID NO: 3; и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4,  
последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 18, и последовательность CDR-L3 SEQ  
ID NO: 6, или

30 – при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1,  
последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 2, и последовательность CDR-H3 SEQ  
ID NO: 3 и VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4,  
последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 18, и последовательность CDR-L3 SEQ  
ID NO: 6.

3. Антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 2, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

5 – переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, 22 или 24; и

10 – переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, 23 или 25.

4. Антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 2, содержащие:

15 – переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, 22 или 24; и

20 – переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, 23 или 25;

при этом:

25 – при этом VH содержит последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 15, последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 3; и

– при этом VL содержит последовательность CDR-L1 SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-L2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 18, и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO: 6.

30 5. Антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 4, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

– переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20, 22 или 24; и

– переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, 23 или 25.

5 6. Антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 5, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а. переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21, соответственно;

10 б. переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23, соответственно; или

в. переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25, соответственно.

15 7. Антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 6, при этом антигенсвязывающий фрагмент выбирают из группы, включающей в себя одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент Fv, диатело и малый миметик антитела.

20 8. Антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 7, при этом указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

25 9. Антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, при этом антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечный фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей в себя SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30 и 31.

10. Антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с по меньшей мере одним аминокислотным остатком, выбранным из группы, включающей в себя остатки 366, 392-396, 413-421, 425, 427, 442, 453 и 478 человеческого компонента C3, как указано в SEQ ID NO: 47.

30 11. Антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются со всеми аминокислотными остатками 366, 392-396, 413-421, 425, 427, 442, 453 и 478 человеческого компонента C3 как указано в SEQ ID NO: 47.

12. Антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 10 или 11, при этом указанное антитело против C3 или его антигенсвязывающий

фрагмент представляет собой антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 9.

5 13. Антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 12, при этом указанное антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент способны ингибировать пути активации комплемента, включая классический путь (CP), лектиновый путь (LP) и альтернативный путь (AP).

10 14. Антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 13, при этом указанное антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент способны связывать комплемент C3 и C3b.

15 15. Антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 14, при этом указанное антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент способны предотвращать образование конвертазы C3.

16. Антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 15, при этом указанное антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент способны проникать через мембрану Бруха.

20 17. Антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 16, при этом указанное антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с человеческим C3 при  $K_D < 50$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 15$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 10$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 7$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 1$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,5$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,2$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,15$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,10$  нМ, 25 предпочтительно при  $K_D < 0,05$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,04$  нМ, или более предпочтительно при  $K_D < 0,03$  нМ.

30 18. Антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 17, при этом указанное антитело против C3 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с человеческим C3b at a  $K_D < 50$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 15$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 10$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 7$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 1$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,5$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,2$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,15$  нМ, предпочтительно при  $K_D < 0,10$  нМ, или более предпочтительно при  $K_D < 0,05$  нМ.



19. Антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 18, имеющие приблизительно эквивалентное сродство связывания с С3 и С3b.

5 20. Антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 19, имеющие сродство связывания с С3а, iС3b, С4, С4b, С5 и/или С5b приблизительно  $10^{-4}$  М или слабее.

21. Антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 19, имеющие более слабое сродство связывания с С3а, iС3b, С4, С4b, С5, и/или С5b по сравнению со сродством связывания с С3 и С3b.

10 22. Антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 19, не имеющие сродства связывания с С3а, iС3b, С4, С4b, С5, и/или С5b.

15 23. Антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 19, способные ингибировать петлю амплификации конвертазы С3.

24. Антитело против С3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 19, способные ингибировать хориоидальную активность С3.

25. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 24 для применения в качестве лекарственного средства.

20 26. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 24 для применения в изготовлении лекарственного средства.

27. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 24 для применения в лечении или предупреждении заболевания глаз.

25 28. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 24 для применения в изготовлении лекарственного средства для лечения или предупреждения заболевания глаз.

30 29. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п. 27 или 28, при этом указанное заболевание выбирают из группы, включающей в себя ретинопатию, пролиферативную ретинопатию (ПР), такую как ретинопатия недоношенных, ишемическую ретинопатию, диабетическую ретинопатию (ДР), включая пролиферативную диабетическую ретинопатию (ПДР) и непролиферативную диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек (ДМО), диабетическую макулярную ишемию (ДМИ), возрастную дегенерацию жёлтого пятна (ВДЖП) включая сухую ВДЖП и

влажную ВДЖП, географическую атрофию (ГА), пигментный ретинит, наследственную дистрофию сетчатки, миопическую дегенерацию, окклюзию вен сетчатки, окклюзию артерий сетчатки, эндофтальмит, увеит, кистозный макулярный отек, хориоидальную неоваскулярную мембрану, вторичную по отношению к каким-либо заболеваниям сетчатки, невропатии зрительного нерва, глаукому, отслойку сетчатки, токсическую ретинопатию, радиационную ретинопатию, травматическую ретинопатию, лекарственную васкулопатию сетчатки, неоваскуляризацию сетчатки, полипloidную хориоидальную васкулопатию, васкулит сетчатки, микроаневризму сетчатки, ретролентальную фиброплазию, хориоретинит, дистрофию Фукса, макулярную телеангиэктазию, синдром Ашера, пароксизмальную ночную гемоглобинурию (ПНГ) и болезнь Штаргардта.

30. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из пп. 27 - 29, при этом указанное заболевание глаз выбирают из группы, включающей в себя возрастную дегенерацию желтого пятна, географическую атрофию, неоваскулярную глаукому и диабетическую ретинопатию.

31. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из пп. 27 - 30, при этом указанное заболевание глаз представляет собой географическую атрофию.

32. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из пп. 27 - 31 для применения в лечении заболевания глаз путем ингибирования активности комплемента классического пути (СР), лектинового пути (LP) и альтернативного пути (AP) или путем ингибирования активности локализованного в хориоиде комплемента С3.

33. Способ диагностики нарушений, связанных с комплементом С3, в биологическом образце с использованием антитела против С3 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1 - 24.

34. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 24 и фармацевтически приемлемый носитель.

35. Фармацевтическая композиция, содержащая полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующие антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 24 и фармацевтически приемлемый носитель.

36. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 24 или фармацевтическая композиция по п. 34, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят парентеральным путем, внутривенным путем, интравитреальным путем или подкожным путем введения.

5 37. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 24 или фармацевтическая композиция по п. 34, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят интравитреальным путем.

38. Выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующие антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 - 24.

10 39. Выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды по п. 38, содержащие:

– последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, или SEQ ID NO: 24, и

15 – последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 25.

40. Вектор экспрессии, содержащий выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды по п. 38 или 39.

41. Клетка-хозяин, содержащая выделенный полинуклеотид или полинуклеотид по п. 38 или 39 или вектор экспрессии по п. 40.

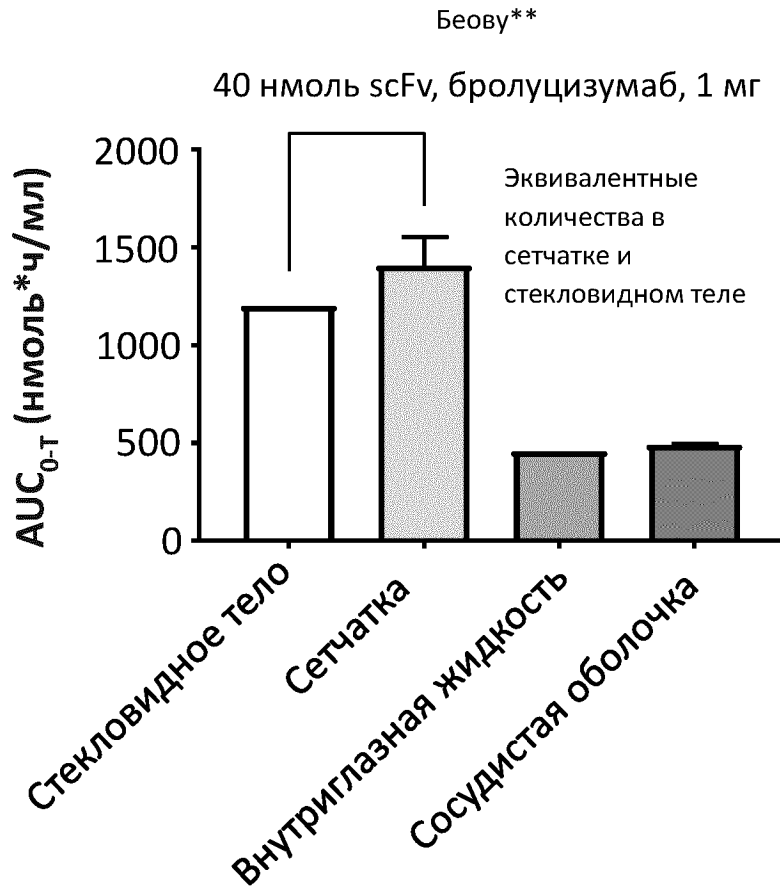
20 42. Способ получения антитела против СЗ или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий в себя:

а. получение клетки-хозяина по п. 41, и

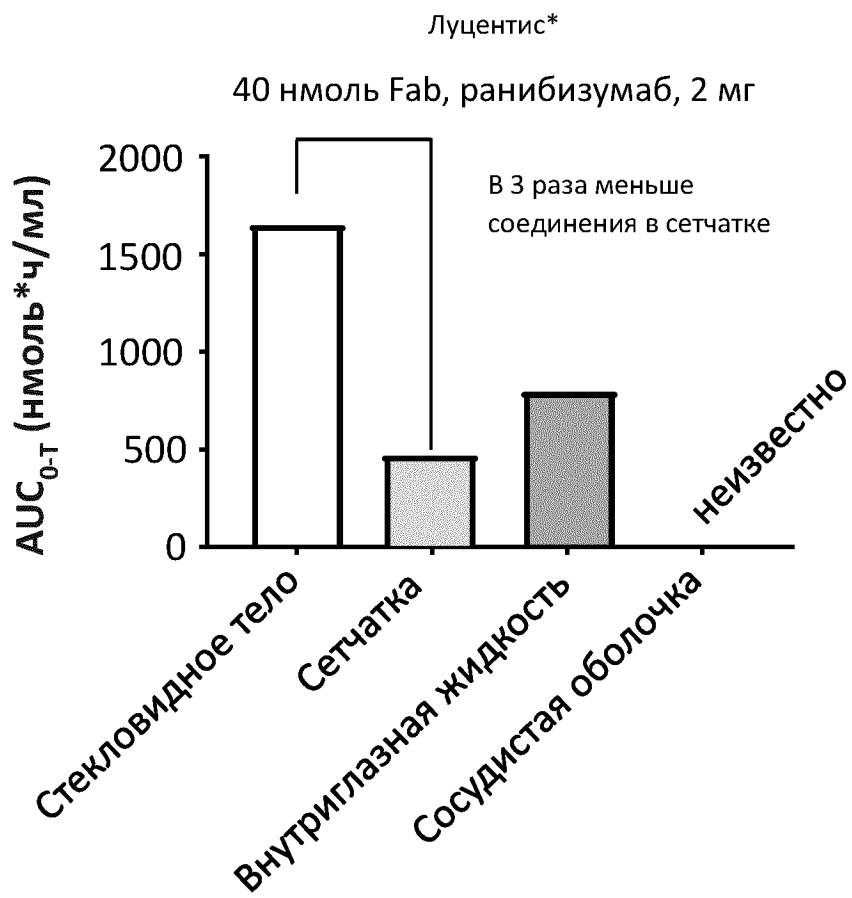
б. культивирование клетки-хозяина.

25 43. Способ по п. 42, дополнительно включающий в себя выделение и очистку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

## ФИГУРЫ



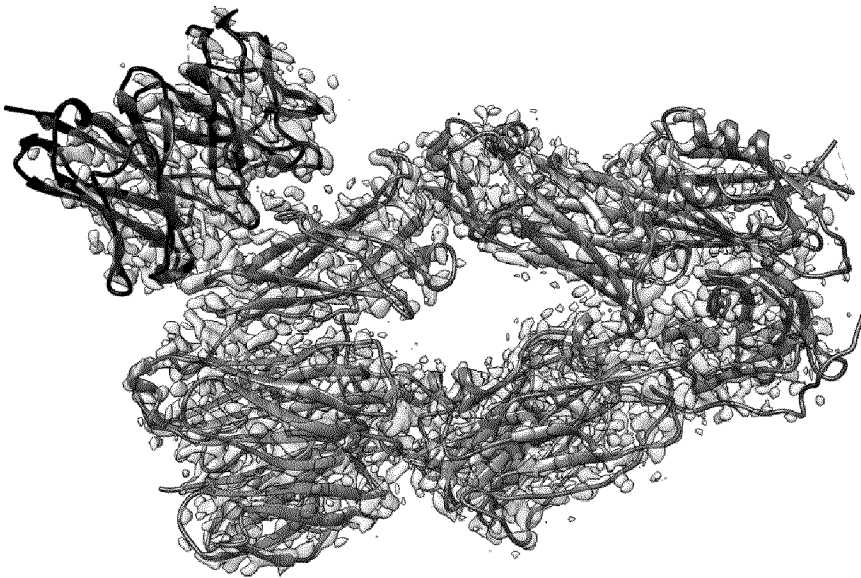
Фигура 1А



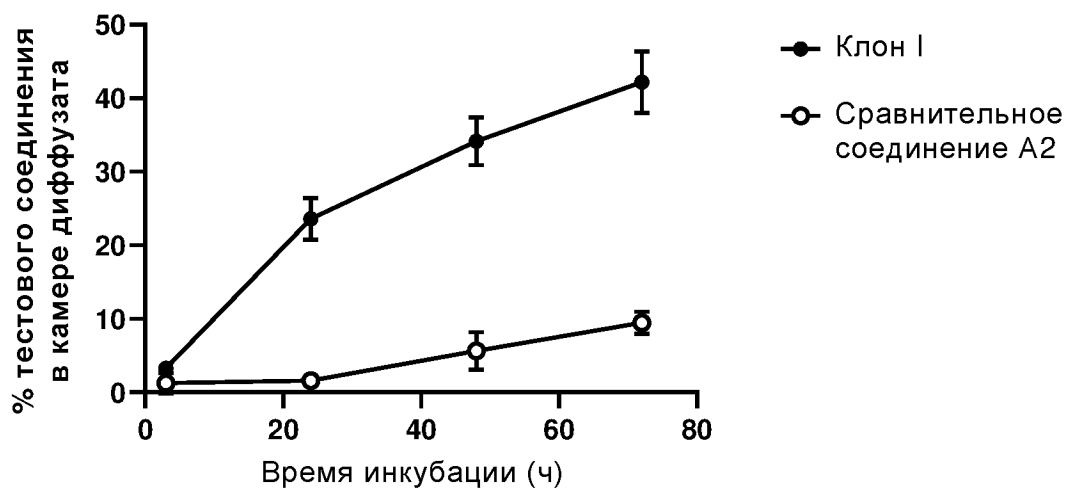
Фигура 1В

360                    370                    380                    390                    400  
SPYQIHFTKT PKYFKPGMPF DLMVFVTNPD GSPAYRVPVA VQGEDTVQSL  
  
410                    420                    430                    440                    450  
TQGDGVAKLS INTHPSQKPL SITVRTKKQE LSEAEQATRT MQALPYSTVG  
  
460                    470                    480                    490                    500  
NSNNYLHLSV LRTELRPGET LNVNFLLRMD RAHEAKIRYY TYLIMNKGRL

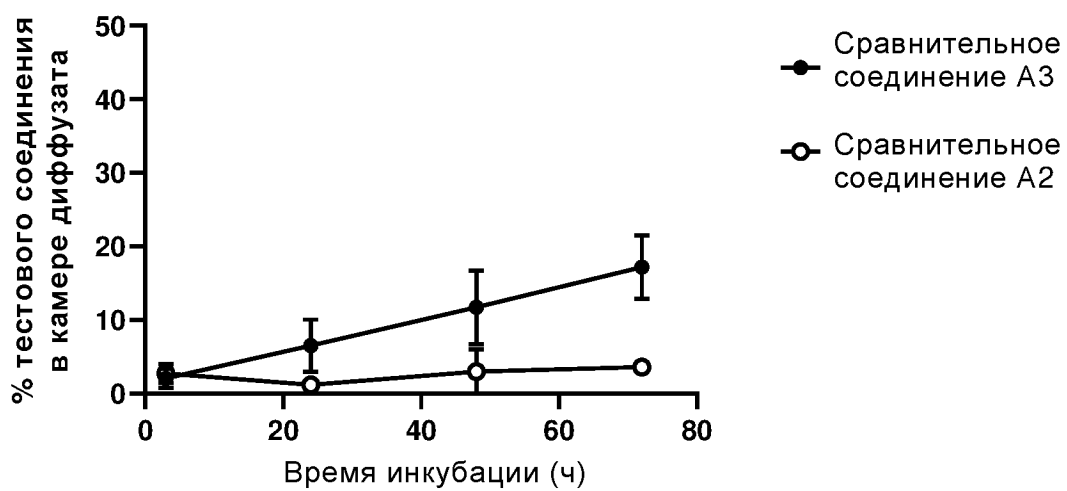
**Фигура 2А**



**Фигура 2В**



**ФИГУРА 3**



**ФИГУРА 4**