

ANTICORPI ANTI-C5 A FARMACOCINETICA MIGLIORATA

(CASO 30092 - EP 2 970 455)

RIASSUNTO

La descrizione fornisce anticorpi che sono utili per, tra le altre cose, inibire il complemento terminale (per esempio l'assemblaggio e/oppure l'attività di C5b-9 TCC) e l'infiammazione mediata dalla anafilatossina C5a e, quindi, trattare i disturbi associati al complemento. Gli anticorpi hanno numerose proprietà migliorate rispetto a eculizumab, comprendenti, per esempio, l'aumento della semi-vita nel siero nell'uomo.

DESCRIZIONE

Campo tecnico

Il campo dell'invenzione è la medicina, l'immunologia, la biologia molecolare e la chimica delle

proteine.

Stato dell'arte

Il sistema del complemento agisce unitamente ad altri sistemi immunologici del corpo per difesa dall'intrusione di agenti patogeni cellulari e virali. Vi sono almeno 25 proteine del complemento, ed è stato trovato che si tratta di una raccolta complessa di proteine plasmatiche e di co-fattori delle membrane. Le proteine plasmatiche costituiscono circa il 10% delle globuline nel siero dei vertebrati. I componenti del complemento svolgono le loro funzioni immunodifensive mediante interazione in una serie di scissioni enzimatiche complesse ma precise ed in eventi leganti la membrana. La cascata del complemento risultante porta alla produzione di prodotti con funzioni opsoniche, immunoregolatorie e litiche. Un riassunto conciso delle attività biologiche associate all'attivazione del complemento viene fornito, per esempio, in The Merck Manual, 16th Edition.

La cascata del complemento può avanzare attraverso il percorso classico (CP), il percorso della lecitina oppure attraverso il percorso alternativo (AP). Il percorso della lecitina viene tipicamente iniziato con il legame della lecitina legante mannosio (MBL) con substrati ad alto contenuto di manno-

sio. L'AP può essere indipendente dagli anticorpi, e può venire iniziato da certe molecole su superfici di patogeni. Il CP viene tipicamente iniziato mediante riconoscimento da parte dell'anticorpo di, e legame con un sito antigenico su una cellula bersaglio. Questi percorsi convergono alla C3 convertasi, il punto in cui il componente del complemento C3 viene scisso da una proteasi attiva, ottenendo C3a e C3b.

La C3 convertasi dell'AP viene iniziata dall'idrolisi spontanea del componente del complemento C3, che abbonda nella frazione plasmatica del sangue. Questo processo, anche noto come "tickover" (scissione di C3 a ritmo lentissimo), si verifica attraverso scissione spontanea di un legame tioestere in C3, formando C3i oppure C3(H₂O). La scissione a ritmo lentissimo viene facilitata dalla presenza di superfici che sostengono il legame di C3 attivato e/oppure hanno caratteristiche di carica neutra o positiva (per esempio superfici di cellule batteriche). Questa formazione di C3(H₂O) consente il legame del fattore B della proteina plasmatica, che a sua volta consente al fattore D la scissione del fattore B in Ba e Bb. Il frammento Bb rimane legato a C3 formando un complesso contenente la C3 convertasi di "fase fluida" oppure di "iniziazione" di C3(H₂O)Bb. Sebbene prodot-

ta solamente in piccole quantità, la C3 convertasi di fase fluida può scindere più proteine C3 in C3a e C3b, ed ha come risultato la generazione di C3b ed il suo successivo legame covalente con una superficie (per esempio una superficie batterica). Il fattore B legato a C3b legato alla superficie viene scisso in fattore D, formando così il complesso C3 convertasi legato alla superficie contenente C3b,Bb. (Si vedano per esempio Muller-Eberhard (1988) Ann Rev Biochem 57:321-347).

La C5 convertasi di AP, (C3b)₂,Bb, viene formata dopo l'aggiunta di un secondo monomero C3b alla C3 convertasi di AP (Si vedano per esempio Medicus et al. (1976) J Exp Med 144: 1076-1093 and Fearon et al. (1975) J Exp Med 142:856-863). Il ruolo della seconda molecola C3b è quello di legarsi a C5 e di presentarla per la scissione da parte di Bb (Si vedano, per esempio, Isenman et al. (1980) J Immunol 124:326-331). Le C3 convertasi e C5 convertasi di AP vengono stabilizzate mediante l'aggiunta della proteina trimerica properdina, come descritto, per esempio, in Medicus et al. (1976), come sopra. Tuttavia, il legame con la properdina non viene richiesto per formare C3 convertasi oppure C5 convertasi funzionanti del percorso alternativo (Si vedano, per esempio, Schrei-

ber et al. (1978) Proc Natl Acad Sci USA 75:3948-3952
e Sissons et al. (1980) Proc Natl Acad Sci USA
77:559-562).

La C3 convertasi del CP viene formata dopo interazione del componente del complemento C1, che è un complesso di C1q, C1r e C1s con un anticorpo che si lega ad un antigene bersaglio (per esempio un antigene microbico). Il legame della porzione C1q di C1 con il complesso anticorpo-antigene causa un cambiamento strutturale in C1, che attiva C1r. C1r attivo scinde quindi il C1s associato a C1 generando in tal modo una serina proteasi attiva. C1s attivo scinde il componente del complemento C4 in C4b e C4a. Analogamente a C3b, il frammento C4b appena generato contiene un titolo altamente attivo che forma facilmente legami ammidi oppure esteri con molecole adatte su una superficie bersaglio (per esempio una superficie delle cellule microbiche). C1s scinde inoltre il componente del complemento C2 in C2b e C2a. Il complesso formato da C4b e C2a è la C3 convertasi del CP, che è in grado di trasformare C3 in C3a e C3b. La C5 convertasi del CP - C4b,C2a,C3b - viene formata dopo aggiunta di un monomero C3b alla C3 convertasi di CP (Si vedano per esempio Muller-Eberhard (1988), come sopra, e Cooper et al. (1970) J Exp Med 132:775-793).

Oltre al suo ruolo nella C3 convertasi e C5 convertasi, C3b agisce anche come opsonina attraverso la sua interazione con i recettori del complemento presenti sulle superfici di cellule che presentano l'antigene, come macrofagi e cellule dendritiche. La funzione opsonica di C3b viene generalmente considerata come una delle funzioni anti-infettive più importanti del sistema del complemento. I pazienti con lesioni genetiche che bloccano la funzione di C3b sono inclini alle infezioni da parte di un'ampia varietà di organismi patogeni, mentre è stato trovato che i pazienti con lesioni più avanti nella sequenza della cascata del complemento, vale a dire pazienti con lesioni che bloccano le funzioni di C5, sono più inclini solo a infezioni da *Neisseria*, e quindi solo in parte sono molto inclini.

Le C5 convertasi dell'AP e del CP scindono C5 in C5a e C5b. La scissione di C5 rilascia C5a, una potente anafilatossina e fattore chemiotattico, e C5b, che consente la formazione del complesso del complemento terminale litico, C5b-9. C5b si combina con C6, C7 e C8 per formare il complesso C5b-8 sulla superficie della cellula bersaglio. Dopo legame di diverse molecole di C9, si forma il complesso di attacco alla membrana (MAC, C5b-9, il complesso del complemento

terminale, TCC). Quando un numero sufficiente di inserti di MAC si inserisce nelle membrane delle cellule bersaglio, le aperture che essi creano (pori di MAC) mediano una lisi osmotica rapida delle cellule bersaglio.

Sebbene un sistema del complemento che funzioni in modo adeguato fornisca una difesa efficace contro i microbi infettanti, una regolazione inappropriata oppure un'attivazione dei percorsi del complemento sono coinvolte nella patogenesi di una varietà di disturbi, comprendenti, per esempio, l'artrite reumatoide (RA); nefrite lupica; asma; danno da ischemia/riperfusionazione; sindrome emolitico-uremica atipica (aHUS); malattia da depositi densi (DDD); emoglobinuria parossistica notturna (PNH); degenerazione maculare (per esempio degenerazione maculare correlata all'età (AMD)); emolisi, enzimi epatici elevati e sindrome da piastrine basse (HELLP); porpora trombotica trombocitopenica (TTP); aborto spontaneo; vasculite pauci-immune; epidermolisi bollosa; aborto ripetuto; sclerosi multipla (MS); danno cerebrale traumatico; e danni che derivano da infarto del miocardio, bypass cardiopolmonare e emodialisi (si vedano per esempio Holers et al. (2008) *Immunological Reviews* 223:300-316.) È stato dimostrato che la regolazione

verso il basso dell'attivazione del complemento è efficace nel trattamento di diverse indicazioni di malattie in una varietà di modelli di animali. Si vedano per esempio Rother et al. (2007) *Nature Biotechnology* 25(11):1256-1264; Wang et al. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8563-8568; Wang et al. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8955-8959; Rinder et al. (1995) *J Clin Invest* 96:1564-1572; Kroshus et al. (1995) *Transplantation* 60:1194-1202; Homeister et al. (1993) *J Immunol* 150: 1055-1064; Weisman et al. (1990) *Science* 249:146-151; Amsterdam et al. (1995) *Am J Physiol* 268:H448-H457; e Rabinovici et al. (1992) *J Immunol* 149:1744-1750.

Igawa et al. (2010) *Nat Biotechnol* 28:1203-1207 descrivono un anticorpo manipolato contro il recettore di IL-6 (IL-6R) che si dissocia rapidamente da IL-6R in un ambiente acido dell'endosoma (pH 6,0), mentre mantiene la sua affinità di legame con IL-6R nel plasma (pH 7,4).

WO2011/111007 descrive anticorpi con il legame dell'antigene dipendente dal pH che preferibilmente si dissociano dall'antigene nell'endosoma.

Rother et al. (2007) *Nat Biotechnol* 25:1256-1264 descrivono la scoperta e lo sviluppo dell'inibitore del complemento eculizumab per il trattamento del-

l'emoglobinuria parossistica notturna.

WO2010/151526 descrive anticorpi bispecifici che possono legarsi con due o più proteine diverse scelte tra C5a, C5b, un recettore cellulare per C5a, il complesso C5b-9 oppure un componente o un intermedio del complemento terminale.

Sommario

La descrizione si riferisce ad anticorpi anti-C5 che hanno una o più caratteristiche migliorate, per esempio rispetto ad anticorpi anti-C5 noti usati per scopi terapeutici. Per esempio, gli anticorpi anti-C5 descritti in questa sede presentano un aumento della semi-vita nel siero rispetto alla semi-vita di eliminazione nel siero di eculizumab. Per il miglioramento delle loro proprietà farmacocinetiche, gli anticorpi descritti in questa sede presentano numerosi vantaggi, per esempio vantaggi rispetto ad altri anticorpi anti-C5 che si legano con, ed inibiscono la scissione di C5 a lunghezza completa oppure maturo. Analogamente a tali anticorpi anti-C5, gli anticorpi descritti in questa sede possono inibire la risposta infiammatoria mediata da C5a e la lisi cellulare dipendente da C5b (MAC) che deriva dalla scissione di C5. Tuttavia, poiché la concentrazione di C5 nel plasma umano è approssimativamente di 0,37 μm (Rawal and Pangburn

(2001) J Immunol 166(4):2635-2642), diventa spesso necessario l'uso di concentrazioni elevate e/oppure una somministrazione frequente di anticorpi anti-C5, come eculizumab, per inibire in modo efficace C5 nell'uomo. La descrizione espone negli esempi operativi dati sperimentali che evidenziano che, sebbene gli anticorpi anti-C5 siano altamente efficaci nell'inibizione del complemento in vitro ed in vivo (si vedano per esempio Hillmen et al. (2004) N Engl J Med 350(6):552), gli anticorpi sono particolarmente sensibili alla clearance mediata dal bersaglio a causa dell'elevata concentrazione di C5 nel sangue. La descrizione mostra inoltre che i nuovi anticorpi descritti in questa sede hanno una sensibilità ridotta alla clearance mediata dal bersaglio ed hanno quindi una semi-vita più lunga di eliminazione nel siero (semi-vita) in confronto agli anticorpi anti-C5 precedentemente noti, nel sangue.

In considerazione della loro semi-vita più lunga, gli anticorpi descritti in questa sede possono venire somministrati all'uomo ad una dose molto più bassa e/oppure meno frequentemente rispetto agli anticorpi anti-C5 precedentemente noti (come eculizumab) e forniscono in modo efficace la stessa inibizione oppure un'inibizione maggiore di C5 nell'uomo.

La capacità di somministrare una dose più bassa dell'anticorpo, in confronto per esempio alla dose di eculizumab, consente inoltre l'utilizzo di altre vie di somministrazione, come per esempio somministrazione subcutanea, somministrazione intramuscolare, somministrazione intrapolmonare e somministrazione attraverso l'uso di microsfere biologicamente degradabili.

Pertanto, in un aspetto, la descrizione si riferisce ad un anticorpo anti-C5 avente una o più proprietà migliorate (per esempio proprietà farmacocinetiche migliorate) rispetto a eculizumab. L'invenzione fornisce un anticorpo isolato, oppure un suo frammento legante l'antigene, che: (a) si lega al componente del complemento C5 umano; (b) inibisce la scissione di C5 in frammenti C5a e C5b; e (c) comprende: (i) una CDR1 della catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi rappresentata in SEQ ID n. 23, (ii) una CDR2 della catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi rappresentata in SEQ ID n. 19, (iii) una CDR3 della catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi rappresentata in SEQ ID n. 3, (iv) una CDR1 della catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi rappresentata in SEQ ID n. 4, (v) una CDR2 della catena leggera comprendente la se-

quenza di amminoacidi rappresentata in SEQ ID n. 5, e (vi) una CDR3 della catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi rappresentata in SEQ ID n. 6.

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo o il frammento dell'invenzione si legano a C5 a pH 7,4 e a 25°C con una costante di dissociazione per l'affinità (K_D) che è nel campo di $0,1 \text{ nM} \leq K_D \leq 1 \text{ nM}$. L'anticorpo o frammento possono legarsi a C5 ad un pH di 7,4 e ad una temperatura di 25°C con una K_D che sia nel campo di $0,2 \text{ nM} \leq K_D \leq 1 \text{ nM}$ oppure con una K_D che sia nel campo di $0,5 \text{ nM} \leq K_D \leq 1 \text{ nM}$.

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo o frammento dell'invenzione si legano a C5 ad un pH di 6,0 e ad una temperatura di 25°C con una K_D che sia $\geq 10 \text{ nM}$ (per esempio $\geq 50 \text{ nM}$, $\geq 100 \text{ nM}$ oppure $\geq 1 \text{ }\mu\text{m}$).

In alcune forme di realizzazione dell'anticorpo o del frammento dell'invenzione, [$(K_D$ dell'anticorpo o del suo frammento legante l'antigene per C5 ad un pH di 6,6 e a 25°C)/(K_D dell'anticorpo o del suo frammento legante l'antigene per C5 a pH 7,4 e a 25°C)] è maggiore di 25. Il [$(K_D$ dell'anticorpo o del suo frammento legante l'antigene per C5 ad un pH di 6,0 e a 25°C)/(K_D dell'anticorpo o del suo frammento legante l'antigene per C5 a pH 7,4 e a 25°C)] può essere maggiore di 100 (per esempio maggiore di 200,

300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1500, 1600, 1800, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, oppure 8500).

La K_D dell'anticorpo o del suo frammento legante l'antigene per C5 a pH 7,4 e a 25°C può essere inferiore a 1 (per esempio inferiore a 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, oppure 0,1) nM.

Sulla base della caratterizzazione di diverse molecole varianti di eculizumab descritte negli esempi operativi, gli inventori hanno scoperto un nuovo genere di anticorpi aventi proprietà farmacocinetiche migliorate in confronto a eculizumab. Gli anticorpi che rientrano in questo genere hanno un'affinità per C5 che è più debole dell'affinità di eculizumab per C5 a pH 7,4. Inoltre gli anticorpi hanno una costante di dissociazione per l'affinità (K_D) per C5 a pH 7,4 che è uguale a, oppure inferiore a 1 nM. Sebbene la descrizione non sia vincolata ad alcuna teoria o meccanismo di azione particolare, gli inventori ritengono che una leggera riduzione dell'affinità di eculizumab per C5 a pH 7,4, e del suo successivo effetto sull'affinità dell'anticorpo per C5 a pH 6,0, mentre si mantiene lo stesso rapporto o un rapporto simile dell'affinità a pH 7,4 e a pH 6,0, ridurrà sostan-

zionalmente la clearance mediata da C5 dell'anticorpo senza sostanzialmente influenzare la funzione inibitoria del complemento dell'anticorpo risultante nei pazienti. Quindi, gli inventori hanno definito un campo di affinità ottimale per gli anticorpi anti-C5 che dà origine a proprietà farmacocinetiche migliorate mentre si mantengono le proprietà farmacodinamiche richieste, ciascuna rispetto a eculizumab. Pertanto, la descrizione si riferisce ad un anticorpo, oppure ad un suo frammento legante l'antigene isolati, che:

- (a) si legano con il componente del complemento C5 a pH 7,4 e a 25°C con una costante di dissociazione per l'affinità (K_D) che è ≤ 1 nM;
- (b) si legano a C5 a pH 6,0 e a 25°C con una K_D che non è inferiore a 10 nM;
- (c) inibiscono la scissione di C5 in frammenti C5a e C5b, in cui $[(K_D \text{ dell'anticorpo o del suo frammento legante l'antigene per C5 ad un pH di 6,0 e a 25°C}) / (K_D \text{ dell'anticorpo o del suo frammento legante l'antigene per C5 a pH 7,4 e a 25°C})]$ è maggiore di, oppure uguale a 25.

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo o il suo frammento comprendono una variante della regione costante di Fc umano (per esempio una variante della regione costante di IgG Fc umana) che si lega al recettore Fc neonatale umano (FcRn) con affinità

maggiore di quella della regione costante di Fc umano nativo da cui deriva la variante della regione costante di Fc umano. La variante della regione costante di Fc può comprendere una o più (per esempio due, tre, quattro o cinque o più) sostituzioni di amminoacidi rispetto alla regione costante di Fc umano nativo da cui deriva la variante della regione costante di Fc umano. La sostituzione può essere, per esempio, alla posizione dell'amminoacido 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434 oppure 436 (numerazione UE) rispetto alla regione costante di Fc umano nativo. La sostituzione può essere una scelta dal gruppo costituito da: metionina per glicina alla posizione 237; alanina per prolina alla posizione 238; lisina per serina alla posizione 239; isoleucina per lisina alla posizione 248; alanina, fenilalanina, isoleucina, metionina, glutammina, serina, valina, triptofano oppure tirosina per treonina alla posizione 250; fenilalanina, triptofano oppure tirosina per metionina alla posizione 252; treonina per serina alla posizione 254; acido glutammico per arginina alla posizione 255; acido aspartico, acido glu-

tammico oppure glutammina per treonina alla posizione 256; alanina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, asparagina, serina, treonina oppure valina per prolina alla posizione 257; istidina per acido glutammico alla posizione 258; alanina per acido aspartico alla posizione 265; fenilalanina per acido aspartico alla posizione 270; alanina oppure acido glutammico per asparagine alla posizione 286; istidina per treonina alla posizione 289; alanina per asparagina alla posizione 297; glicina per serina alla posizione 298; alanina per valina alla posizione 303; alanina per valina alla posizione 305; alanina, acido aspartico, fenilalanina, glicina, istidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutammina, arginina, serina, valina, triptofano oppure tirosina per treonina alla posizione 307; alanina, fenilalanina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, glutammina oppure treonina per valina alla posizione 308; alanina, acido aspartico, acido glutammico, prolina oppure arginina per leucina o valina alla posizione 309; alanina, istidina oppure isoleucina per glutammina alla posizione 311; alanina oppure istidina per acido aspartico alla posizione 312; lisina oppure arginina per leucina alla posizione 314; alanina oppure istidina per asparagina alla po-

sizione 315; alanina per lisina alla posizione 317; glicina per asparagina alla posizione 325; valina per isoleucina alla posizione 332; leucina per lisina alla posizione 334; istidina per lisina alla posizione 360; alanina per acido aspartico alla posizione 376; alanina per acido glutammico alla posizione 380; alanina per acido glutammico alla posizione 382; alanina per asparagina oppure serina alla posizione 384; acido aspartico oppure istidina per glicina alla posizione 385; prolina per glutammina alla posizione 386; acido glutammico per prolina alla posizione 387; alanina oppure serina per asparagina alla posizione 389; alanina per serina alla posizione 424; alanina, acido aspartico, fenilalanina, glicina, istidina, isoleucina, lisina, leucina, asparagina, prolina, glutammina, serina, treonina, valina, triptofano oppure tirosina per metionina alla posizione 428; lisina per istidina alla posizione 433; alanina, fenilalanina, istidina, serina, triptofano oppure tirosina per asparagina alla posizione 434; e istidina per tirosina oppure fenilalanina alla posizione 436, tutte nella numerazione UE.

In alcune forme di realizzazione degli anticorpi o dei frammenti leganti l'antigene dell'invenzione, la variante della regione costante di Fc umano com-

prende una metionina alla posizione 428 ed una asparagina alla posizione 434, ciascuna nella numerazione UE.

In alcune forme di realizzazione, qualsiasi degli anticorpi o dei loro frammenti leganti l'antigene dell'invenzione può comprendere, oppure può essere costituito da un polipeptide a catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi rappresentata nella SEQ ID n. 12 o 14 e da un polipeptide a catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi rappresentata in SEQ ID n. 8 oppure 11. L'anticorpo o il frammento legante l'antigene dell'invenzione possono comprendere la regione costante della catena pesante rappresentata in SEQ ID n. 13.

La descrizione si riferisce inoltre ad un anticorpo comprendente la regione variabile della catena pesante di eculizumab (SEQ ID n. 7) oppure le CDR della regione della catena pesante di eculizumab (SEQ ID n. 1-3) e qualsiasi delle varianti delle regioni costanti di Fc umano descritte in questa sede, per esempio la variante della regione costante di Fc umano comprendente una metionina alla posizione 428 ed un'asparagina alla posizione 434, ciascuna nella numerazione UE.

In una forma di realizzazione, l'anticorpo oppu-

re il frammento legante l'antigene hanno una semi-vita aumentata nell'uomo rispetto alla semi-vita nel siero di eculizumab. Il termine semi-vita usato in questa sede viene definito come il tempo necessario affinché la concentrazione del farmaco a base di anticorpo nel plasma nel corpo venga ridotta della metà o del 50%. Questa riduzione del 50% della concentrazione del siero riflette la quantità di farmaco circolante e non rimosso dai metodi naturali di clearance di anticorpi. La semi-vita di eculizumab è stata determinata in $272 + 82$ ore oppure 11,3 giorni in pazienti affetti da PNH e 12,1 giorni in pazienti affetti da aHUS (si vedano Soliris Prescribing information). La semi-vita di anticorpi o frammenti descritti in questa sede nell'uomo può venire aumentata rispetto alla semi-vita di eculizumab nell'uomo. L'aumento della semi-vita rispetto a eculizumab può essere almeno di 1,5 volte la semi-vita di eculizumab, almeno 2 volte la semi-vita di eculizumab, almeno 2,5 volte la semi-vita di eculizumab oppure almeno 3 volte la semi-vita di eculizumab.

Qualsiasi degli anticorpi o frammenti descritti in questa sede può avere una semi-vita nel siero di un uomo che sia maggiore di, oppure almeno di 10 giorni (per esempio maggiore di, oppure almeno di 11,

12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 oppure 40). Questa semi-vita (oppure estensione della semi-vita rispetto a eculizumab) può venire ottenuta, in alcune forme di realizzazione, mediante un anticorpo descritto in questa sede contenente una regione costante di Fc umano presente in natura. La semi-vita può venire misurata rispetto ad un anticorpo che comprende una variante della regione costante di Fc umano descritta in questa sede. La semi-vita nell'uomo di anticorpi o frammenti descritti in questa sede può venire aumentata rispetto alla semi-vita nell'uomo di eculizumab. In una forma di realizzazione, la semi-vita nel siero di un uomo dell'anticorpo dell'invenzione è di almeno 25 giorni.

Qualsiasi degli anticorpi o frammenti descritti in questa sede può essere umanizzato, completamente umano, deimmunizzato oppure chimerico. In alcune forme di realizzazione, un anticorpo o un suo frammento descritti in questa sede possono essere, per esempio, un anticorpo ricombinante, un anticorpo a catena singola, un diacorpo, un intracorpo, un frammento di Fv, un frammento di Fd, un frammento di Fab, un frammento di Fab' ed un frammento di F(ab')₂.

Qualsiasi degli anticorpi o dei lori frammenti

descritti in questa sede può comprendere una parte eterologa, per esempio uno zucchero. Per esempio, l'anticorpo o il suo frammento possono venire glicosilati. La parte eterologa può anche essere un marcatore rilevabile, per esempio un marcatore fluorescente, un marcatore luminescente, un marcatore di metallo pesante, un marcatore radioattivo oppure un marcatore enzimatico.

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo o il suo frammento legante l'antigene dell'invenzione possono venire prodotti in una cellula di CHO. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo oppure il suo frammento legante l'antigene non contengono residui di acido sialico rilevabili.

Qualsiasi degli anticorpi o dei suoi frammenti leganti l'antigene descritti in questa sede può venire modificato con una parte che migliora uno oppure entrambi di: (a) la stabilizzazione dell'anticorpo oppure del suo frammento legante l'antigene in circolazione e (b) il mantenimento dell'anticorpo o del suo frammento legante l'antigene in circolazione. Tale parte può essere PEG (PEGilazione).

La descrizione si riferisce ad un acido nucleico che codifica per uno oppure entrambi i polipeptidi a catena pesante e leggera di qualsiasi degli anticorpi

o dei frammenti leganti l'antigene descritti in questa sede. Viene anche rappresentato un vettore (per esempio un vettore di clonazione o di espressione) che comprende l'acido nucleico ed una cellula (per esempio un cellula di insetto, una cellula batterica, una cellula fungina oppure una cellula di mammifero) comprendente il vettore. La descrizione fornisce inoltre un metodo per la produzione di qualsiasi degli anticorpi o dei loro frammenti leganti l'antigene descritti in questa sede. I metodi comprendono, opzionalmente, fornire la suddescritta cellula (oppure coltura di cellule) contenente un vettore di espressione (integrato oppure extracromosomiale), il quale vettore contiene un acido nucleico che codifica per uno oppure entrambi i polipeptidi a catena pesante e a catena leggera di qualsiasi degli anticorpi oppure frammenti leganti l'antigene descritti in questa sede. La cellula oppure la coltura dei cellule vengono coltivate in condizioni e per un periodo di tempo sufficienti a consentire l'espressione mediante la cellula (oppure la coltura di cellule) dell'anticorpo oppure del suo frammento legante l'antigene codificato dall'acido nucleico. Il metodo può anche comprendere l'isolamento dell'anticorpo oppure del suo frammento legante l'antigene dalla cellula (o dalle cel-

lule della coltura) oppure dai mezzi in cui la cellule o le cellule vengono coltivate.

In un altro aspetto, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente un veicolo farmaceuticamente accettabile ed uno o più di qualsiasi degli anticorpi o loro frammenti leganti l'antigene dell'invenzione.

In un altro aspetto, l'invenzione fornisce un kit terapeutico comprendente: (i) uno o più di qualsiasi degli anticorpi o loro frammenti leganti l'antigene dell'invenzione e (ii) mezzi per la somministrazione dell'anticorpo o del suo frammento legante l'antigene ad un uomo. I mezzi possono essere, per esempio, una siringa oppure una pompa.

In un altro aspetto ancora, l'invenzione fornisce un articolo di produzione comprendente: un contenitore comprendente un marcatore ed una composizione comprendente uno o più di qualsiasi degli anticorpi oppure loro frammenti leganti l'antigene dell'invenzione, in cui il marcatore indica che la composizione deve venire somministrata ad un uomo avente, o che si sospetta abbia, oppure a rischio di sviluppare, una condizione associata al complemento. L'articolo di produzione può comprendere inoltre uno o più di altri agenti terapeutici attivi per l'uso nel trattamento

di un uomo avente, che si sospetta abbia oppure a rischio di sviluppare, una condizione associata al complemento.

In un altro aspetto, l'invenzione fornisce uno o più degli anticorpi o dei loro frammenti leganti l'antigene dell'invenzione per l'uso in un metodo per il trattamento di un paziente affetto da una condizione associata al complemento. La condizione associata al complemento può essere, per esempio, una condizione scelta dal gruppo costituito da artrite reumatoide, sindrome da anticorpi antifosfolipidi, nefrite lupica; danno da ischemia/riperfusion; sindrome emolitico-uremica atipica; emoglobinuria parossistica notturna; malattia da depositi densi; neuromielite ottica; neuropatia motoria multifocale; sclerosi multipla, degenerazione maculare, sindrome da HELLP, aborto spontaneo, porpora trombotica trombocitopenica, vasculite pauci-immune, epidermolisi bollosa, aborto ripetuto, danno cerebrale traumatico, miocardite, disturbo cerebrovascolare, disturbo vascolare periferico, disturbo renovascolare, disturbo vascolare mesenterico/enterico, vasculite, nefrite porpora di Henoch-Schonlein, vasculite associata a lupus eritematoso sistemico, vasculite associata ad artrite reumatoide, vasculite del complesso immune, malattia

di Takayasu, cardiomiopatia dilatativa, angiopatia diabetica, malattia di Kawasaki, embolia gassosa venosa, restenosi in seguito a posizionamento dello stent, aterectomia rotazionale, angioplastica coronarica transluminale percutanea, miastenia gravis, malattia da agglutinine fredda, dermatomiosite, emoglobinuria da freddo, sindrome antifosfolipide, malattia di Graves, aterosclerosi, morbo di Alzheimer, sepsi da risposta infiammatoria sistemica, shock settico, lesione del midollo spinale, glomerulonefrite, rigetto del trapianto (per esempio trapianto di rene), tiroidite di Hashimoto, diabete di tipo I, psoriasi, pemfigo, anemia emolitica autoimmune, porpora trombocitopenica idiopatica, sindrome di Goodpasture, malattia di Degos e sindrome antifosfolipide catastrofica. Preferibilmente, la condizione associata al complemento è la emoglobinuria parossistica notturna (PNH) oppure la sindrome emolitico-uremica atipica (aHUS).

Il termine "anticorpo" usato in questa sede si riferisce ad un anticorpo intero comprendente due polipeptidi a catena leggera e due polipeptidi a catena pesante. Gli anticorpi interi comprendono isotopi di anticorpi differenti comprendenti anticorpi IgM, IgG, IgA, IgD e IgE. Il termine "anticorpo" comprende un

anticorpo policlonale, un anticorpo monoclonale, un anticorpo chimerizzato o chimerico, un anticorpo umanizzato, un anticorpo primatizzato, un anticorpo deimmunizzato ed un anticorpo completamente umano. L'anticorpo può essere realizzato oppure può derivare da qualsiasi di una varietà di specie, per esempio mammiferi come l'uomo, primati non umani (per esempio orangotango, babbuino o scimpanzé), cavalli, bovini, maiali, pecore, capre, cani, gatti, conigli, porcellini d'India, gerbilli, criceti, ratti e topi. L'anticorpo può essere un anticorpo purificato oppure ricombinante.

Le espressioni usate in questa sede " frammento di anticorpo", " frammento legante l'antigene" o espressioni simili si riferiscono ad un frammento di un anticorpo che mantiene la capacità di legarsi ad un antigene bersaglio (per esempio C5 umano) ed inhibire l'attività dell'antigene bersaglio. Tali frammenti comprendono, per esempio, un anticorpo a catena singola, un frammento di Fv a catena singola (scFv), un frammento di Fd, un frammento di Fab, un frammento di Fab' oppure un frammento di $F(ab')_2$. Un frammento di scFv è una catena polipeptidica singola che comprende la regione variabile sia a catena pesante sia a catena leggera dell'anticorpo da cui deriva scFv.

Inoltre, gli intracorpi, i minicorpi, i triacorpi e i diacorpi vengono anche compresi nella definizione di anticorpo, e sono compatibili per l'uso nei metodi descritti in questa sede. Si vedano, per esempio, Todorovska et al. (2001) *J Immunol Methods* 248(1:47-66; Hudson and Kortt (1999) *J Immunol Methods* 231(1):177-189; Poljak (1994) *Structure* 2(12):1121-1123; Rondon and Marasco (1997) *Annual Review of Microbiology* 51:257-283.

L'espressione usata in questa sede "frammento di anticorpo" comprende inoltre, per esempio, anticorpi a dominio singolo come anticorpi a dominio singolo camelizzato. Si vedano per esempio Muyldermans et al. (2001) *Trends Biochem Sci* 26:230-235; Nuttall et al. (2000) *Curr Pharm Biotech* 1:253-263; Reichmann et al. (1999) *J Immunol Meth* 231:25-38; pubblicazioni delle domande PCT numeri WO 94/04678 e WO 94/25591; e brevetto U.S n. 6.005.079. In alcune forme di realizzazione, la descrizione fornisce anticorpi a dominio singolo comprendenti due domini VH con modifiche tali da formare gli anticorpi a dominio singolo.

Un frammento legante l'antigene può comprendere la regione variabile di un polipeptide a catena pesante e la regione variabile di un polipeptide a catena leggera. Un frammento legante l'antigene de-

scritto in questa sede può comprendere le CDR del polipeptide a catena leggera e a catena pesante di un anticorpo.

A meno che sia diversamente indicato, tutti i termini tecnici e scientifici usati in questa sede hanno lo stesso significato comunemente compreso da un esperto del settore al quale la descrizione si riferisce. Metodi e materiali preferiti vengono descritti in quanto segue, sebbene possano venire anche usati metodi e materiali simili oppure equivalenti a quelli descritti in questa sede nella realizzazione o nelle prove dei metodi e delle composizioni descritte nella presente.

Altre caratteristiche e vantaggi della presente descrizione, per esempio metodi per il trattamento o la prevenzione di una condizione associata al complemento, saranno evidenti dalla seguente descrizione, dai seguenti esempi e dalle rivendicazioni.

Breve descrizione delle sequenze

SEQ ID n. 1 rappresenta la sequenza di amminoacidi della CDR1 della catena pesante di eculizumab (definita secondo la definizione combinata di Kabat-Chothia).

SEQ ID n. 2 rappresenta la sequenza di amminoacidi della CDR2 della catena pesante eculizumab (de-

finita secondo la definizione di Kabat).

SEQ ID n. 3 rappresenta la sequenza di amminoacidi della CDR3 della catena pesante di eculizumab (definita secondo la definizione combinata di Kabat).

SEQ ID n. 4 rappresenta la sequenza di amminoacidi della CDR1 della catena leggera di eculizumab (definita secondo la definizione di Kabat).

SEQ ID n. 5 rappresenta la sequenza di amminoacidi della CDR2 della catena leggera di eculizumab (definita secondo la definizione di Kabat).

SEQ ID n. 6 rappresenta la sequenza di amminoacidi della CDR3 della catena leggera di eculizumab (definita secondo la definizione di Kabat).

SEQ ID n. 7 rappresenta la sequenza di amminoacidi della regione variabile della catena pesante di eculizumab.

SEQ ID n. 8 rappresenta la sequenza di amminoacidi della regione variabile della catena leggera di eculizumab e dell'anticorpo BNJ441.

SEQ ID n. 9 rappresenta la sequenza di amminoacidi della regione costante della catena pesante di eculizumab.

SEQ ID n. 10 rappresenta la sequenza di amminoacidi dell'intera catena pesante di eculizumab.

SEQ ID n. 11 rappresenta la sequenza di amminoacidi

cidi dell'intera catena leggera di eculizumab e dell'anticorpo BNJ441.

SEQ ID n. 12 rappresenta la sequenza di amminoacidi della regione variabile della catena pesante dell'anticorpo BNJ441.

SEQ ID n. 13 rappresenta la sequenza di amminoacidi della regione costante della catena pesante dell'anticorpo BNJ441.

SEQ ID n. 14 rappresenta la sequenza di amminoacidi dell'intera catena pesante dell'anticorpo BNJ441.

SEQ ID n. 15 rappresenta la sequenza di amminoacidi di una variante della regione costante della catena pesante di IgG2 comprendente le sostituzioni YTE.

SEQ ID n. 16 rappresenta la sequenza di amminoacidi dell'intera catena pesante di una variante di eculizumab comprendente la regione costante della catena pesante in SEQ ID n. 15 (precedente).

SEQ ID n. 17 rappresenta la sequenza di amminoacidi della CDR1 della catena leggera di eculizumab (definita secondo la definizione di Kabat) con una sostituzione di glicina per istidina alla posizione 8 rispetto a SEQ ID n. 4.

SEQ ID n. 18 rappresenta la sequenza di amminoacidi

cidi della regione variabile della catena leggera dell'anticorpo EHG303.

SEQ ID n. 19 rappresenta la sequenza di amminoacidi della CDR2 della catena pesante di eculizumab in cui la serina alla posizione 8 rispetto a SEQ ID n. 2 è sostituita con una istidina.

SEQ ID n. 20 rappresenta la sequenza di amminoacidi del cosiddetto marcatore del "FLAG".

SEQ ID n. 21 rappresenta una sequenza di poliididina comunemente usata come marcatore antigenico.

SEQ ID n. 22 rappresenta la sequenza di amminoacidi del cosiddetto marcatore emoagglutinina.

SEQ ID n. 23 rappresenta la sequenza di amminoacidi della CDR1 della catena pesante di eculizumab in cui la tirosina alla posizione 2 (rispetto a SEQ ID n. 1) è sostituita con istidina.

SEQ ID n. 24 rappresenta la sequenza di amminoacidi del polipeptide a catena pesante dell'anticorpo EHG303.

SEQ ID n. 25 rappresenta la sequenza di amminoacidi del polipeptide a catena leggera dell'anticorpo EHG303.

SEQ ID n. 26 rappresenta la sequenza di amminoacidi del polipeptide a catena pesante dell'anticorpo EHL049.

SEQ ID n. 27 rappresenta la sequenza di amminoacidi del polipeptide a catena leggera dell'anticorpo EHL049.

SEQ ID n. 28 rappresenta la sequenza di amminoacidi del polipeptide a catena pesante EHL000.

SEQ ID n. 29 rappresenta la sequenza di amminoacidi del polipeptide a catena leggera dell'anticorpo EHL000.

SEQ ID n. 30 rappresenta la sequenza di amminoacidi del polipeptide a catena leggera di BHL006.

SEQ ID n. 31 rappresenta la sequenza di amminoacidi del polipeptide a catena pesante dell'anticorpo BHL006.

SEQ ID n. 32 rappresenta la sequenza di amminoacidi del polipeptide a catena leggera dell'anticorpo BHL009.

SEQ ID n. 33 rappresenta la sequenza di amminoacidi della catena pesante dell'anticorpo BHL009.

SEQ ID n. 34 rappresenta la sequenza di amminoacidi della catena leggera dell'anticorpo BHL0011.

SEQ ID n. 35 rappresenta la sequenza di amminoacidi della catena pesante dell'anticorpo BHL011.

Breve descrizione dei disegni

La **fig. 1** è un grafico a linee che rappresenta la clearance di eculizumab dal siero di topi transge-

nici FcRn umani in presenza o assenza di C5 umano esogeno. L'asse delle Y rappresenta la percentuale di anticorpi rimanenti nel siero, e l'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

La **fig. 2** è un grafico a linee che rappresenta la clearance di una variante di eculizumab avente una regione costante di IgG2 (Ecu-IgG2) e l'anticorpo Ecu-IgG2 contenente le sostituzioni YTE (Ecu-IgG2(YTE)) dal siero di topi. L'asse delle Y rappresenta la percentuale di anticorpi rimanenti nel siero e l'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

La **fig. 3** è un grafico a linee che rappresenta la clearance di una variante di eculizumab avente una regione costante di IgG2 (Ecu-IgG2) e l'anticorpo Ecu-IgG2 contenente le sostituzioni YTE (Ecu-IgG2(YTE)) dal siero di topi. Gli esperimenti sono stati eseguiti in presenza o assenza di C5 umano esogeno. L'asse delle Y rappresenta la percentuale di anticorpo rimanente nel siero e l'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

La **fig. 4** è un diagramma sensorgramma che rappresenta le cinetiche di associazione (a pH 7,4) e di dissociazione (a pH 7,4 e pH 6,0) per tre anticorpi anti-C5: EHL000, EHG303 e EHL049. L'asse delle Y è in unità arbitrarie, mentre l'asse delle X rappresenta

il tempo (in secondi).

La **fig. 5A** è un diagramma sensorgramma che rappresenta le cinetiche di dissociazione a pH 7,4 e a pH 6,0 per l'anticorpo EHG303 (doppia sostituzione Y27H-S57H), la variante a sostituzione singola Y27H di eculizumab, e eculizumab (ecu; Ec293F). L'asse delle Y è in nanometri (nm), mentre l'asse delle X rappresenta il tempo (in secondi).

La **fig. 5B** è un diagramma sensorgramma che rappresenta le cinetiche di dissociazione a pH 7,4 e a pH 6,0 per l'anticorpo EHG304 (doppia sostituzione I34H-L52H), la variante con sostituzione singola I34H di eculizumab, e eculizumab (ecu; Ec293F). L'asse delle Y è in nanometri (nm), mentre l'asse delle X rappresenta il tempo (in secondi). L'anticorpo EHG304 non ha soddisfatto la seconda soglia di selezione, vale a dire che ha superato la variazione massima tollerata (da eculizumab) per dissociazione a pH 7,4.

La **fig. 5C** è un diagramma sensorgramma che rappresenta le cinetiche di dissociazione a pH 7,4 e a pH 6,0 per l'anticorpo EHG303 (doppia sostituzione Y27H-S57H) e eculizumab (ecu; Ec293F). L'asse delle Y è in nanometri (nm), mentre l'asse delle X rappresenta il tempo (in secondi).

La **fig. 5D** è un diagramma sensorgramma che rap-

presenta le cinetiche di dissociazione a pH 7,4 e a pH 6,0 per l'anticorpo EHL049 [G31H (catena leggera)/Y27H-S57H doppia sostituzione (catena pesante)], la variante con doppia sostituzione Y27H-S57H (EHG303) di eculizumab, e eculizumab (ecu). L'asse delle Y è in nanometri (nm), mentre l'asse delle X rappresenta il tempo (in secondi).

La **fig. 5E** è un diagramma sensorgramma che rappresenta le cinetiche di dissociazione a pH 7,4 e a pH 6,0 per l'anticorpo EHL058 [G31H (catena leggera)/L52H-S57H doppia sostituzione (catena pesante)], la variante con doppia sostituzione L52H-S57H (catena pesante) di eculizumab, e eculizumab (ecu). L'asse delle Y è in nanometri (nm), mentre l'asse delle X rappresenta il tempo (in secondi). L'anticorpo EHL058 non ha soddisfatto la seconda soglia di selezione, vale a dire ha superato la variazione massima tollerata (da eculizumab) per dissociazione a pH 7,4.

La **fig. 6** è un grafico a linee che rappresenta la clearance di EHL000, BNJ421 e BNJ423 dal siero di topi NOD/scid carenti di C5. L'asse delle Y rappresenta la percentuale di anticorpi rimanenti nel siero e l'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

La **fig. 7** è un grafico a linee che rappresenta la clearance di EHL000, BNJ421 e BNJ423 dal siero di

topi NOD/scid carenti di C5 in presenza oppure assenza di C5 umano. L'asse delle Y rappresenta la percentuale di anticorpi rimanenti nel siero e l'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

La **fig. 8** è un grafico a linee che rappresenta l'attività degli anticorpi EHL000, BNJ423 e BNJ421 in un saggio emolitico ex vivo. L'asse delle Y rappresenta la percentuale di emolisi e l'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

La **fig. 9A** è un grafico a linee che rappresenta le farmacocinetiche dell'anticorpo BHL011 in topi transgenici hFcRn. Ciascuna linea rappresenta un animale differente. L'asse delle Y rappresenta la concentrazione di anticorpi in $\mu\text{g/ml}$. L'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

La **fig. 9B** è un grafico a linee che rappresenta le farmacocinetiche dell'anticorpo BHL011 in topi transgenici hFcRn. Ciascuna linea rappresenta un animale differente. L'asse delle Y rappresenta la percentuale della concentrazione di anticorpi al giorno 1 rimanente nel siero in ciascun punto del tempo. L'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

La **fig. 10A** è un grafico a linee che rappresenta le farmacocinetiche dell'anticorpo BHL006 in topi transgenici hFcRn. Ciascuna linea rappresenta un ani-

male differente. L'asse delle Y rappresenta la concentrazione di anticorpi in $\mu\text{g/ml}$. L'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

La **fig. 10B** è un grafico a linee che rappresenta le farmacocinetiche dell'anticorpo BHL006 in topi transgenici hFcRn. Ciascuna linea rappresenta un animale differente. L'asse delle Y rappresenta la percentuale della concentrazione di anticorpi al giorno 1 rimanente nel siero in ciascun punto del tempo. L'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

La **fig. 11A** è un grafico a linee che rappresenta le farmacocinetiche dell'anticorpo BHL009 in topi transgenici hFcRn. Ciascuna linea rappresenta un animale differente. L'asse delle Y rappresenta la concentrazione di anticorpi in $\mu\text{g/ml}$. L'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

La **fig. 11B** è un grafico a linee che rappresenta le farmacocinetiche dell'anticorpo BHL009 in topi transgenici hFcRn. Ciascuna linea rappresenta un animale differente. L'asse delle Y rappresenta la percentuale della concentrazione di anticorpi al giorno 1 rimanente nel siero in ciascun punto del tempo. L'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

La **fig. 12** è un grafico a linee che rappresenta un diagramma in scala logaritmica delle farmacocine-

tiche medie degli anticorpi BHL011, BHL006 e BHL009 in topi transgenici hFcRn. Ciascuna linea rappresenta un anticorpo differente come indicato. L'asse delle Y rappresenta la percentuale della concentrazione di anticorpi al giorno 1 rimanenti nel siero in ciascun punto del tempo. L'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

La **fig. 13** è un grafico a linee che rappresenta un diagramma lineare delle farmacocinetiche medie degli anticorpi BHL011, BHL006 e BHL009 in topi transgenici hFcRn. Ciascuna linea rappresenta un anticorpo differente come indicato. L'asse delle Y rappresenta la percentuale della concentrazione di anticorpi al giorno 1 rimanenti nel siero in ciascun punto del tempo. L'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

La **fig. 14** è un grafico a linee che rappresenta la capacità bloccante dell'anticorpo BHL011 in un saggio emolitico del siero ex vivo dopo una dose singola. L'asse delle Y rappresenta la percentuale di emolisi (rispetto ai livelli pre-dose) e l'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

La **fig. 15** è un grafico a linee che rappresenta la capacità bloccante dell'anticorpo BHL006 in un saggio emolitico del siero ex vivo dopo una dose sin-

gola. L'asse delle Y rappresenta la percentuale di emolisi (rispetto ai livelli pre-dose) e l'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

La **fig. 16** è un grafico a linee che rappresenta la capacità bloccante dell'anticorpo BHL009 in un saggio emolitico del siero ex vivo dopo una dose singola. L'asse delle Y rappresenta la percentuale di emolisi (rispetto ai livelli pre-dose) e l'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

La **fig. 17** è un grafico che rappresenta la correlazione tra la concentrazione nel siero di BHL011 e l'attività emolitica nel siero ex vivo dopo una dose singola. L'asse delle Y rappresenta la percentuale di emolisi (rispetto ai livelli pre-dose) e l'asse delle X rappresenta la concentrazione di anticorpi in $\mu\text{g/ml}$.

La **fig. 18** è un grafico che rappresenta la correlazione tra la concentrazione nel siero di BHL006 e l'attività emolitica nel siero ex vivo dopo una dose singola. L'asse delle Y rappresenta la percentuale di emolisi (rispetto ai livelli pre-dose) e l'asse delle X rappresenta la concentrazione di anticorpi in $\mu\text{g/ml}$.

La **fig. 19** è un grafico che rappresenta la correlazione tra la concentrazione nel siero di BHL009 e

l'attività emolitica nel siero ex vivo dopo una dose singola. L'asse delle Y rappresenta la percentuale di emolisi (rispetto ai livelli pre-dose) e l'asse delle X rappresenta la concentrazione di anticorpi in $\mu\text{g/ml}$.

La **fig. 20** è un grafico a linee che rappresenta l'attività emolitica media ex vivo dopo una dose singola di BHL011, BHL009 e BHL006 in topi transgenici hFcRn. Ciascuna linea rappresenta un anticorpo diverso come indicato. L'asse delle Y rappresenta la percentuale di emolisi (rispetto ai livelli pre-dose) e l'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

Le **figure 21A e 21B** indicano una coppia di grafici a linee che rappresentano i diagrammi semi log (fig. 21A) e lineare (fig. 21B) dell'affinità di BNJ441 e di eculizumab in funzione del pH. L'asse delle Y rappresenta la percentuale di dissociazione e l'asse delle X rappresenta il pH.

La **fig. 22** è un grafico a linee che rappresenta le farmacocinetiche di BNJ441 e eculizumab in topi NOD/scid e in assenza di C5 umano. L'asse delle Y rappresenta la concentrazione di anticorpo in $\mu\text{g/ml}$. L'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

La **fig. 23** è un grafico a linee che rappresenta le farmacocinetiche di BNJ441 e eculizumab in topi

NOD/scid e in presenza di C5 umano. L'asse delle Y rappresenta la concentrazione di anticorpo in $\mu\text{g/ml}$. L'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

La **fig. 24** è un grafico a linee che rappresenta la percentuale di BNJ441 e eculizumab rimanenti nel siero di topi NOD/scid in presenza di C5 umano in funzione del tempo. L'asse delle Y rappresenta la concentrazione di anticorpi in $\mu\text{g/ml}$. L'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

La **fig. 25** è un grafico a linee che rappresenta la capacità bloccante emolitica nel siero ex vivo dell'anticorpo BNJ441 e di eculizumab dopo una dose singola in funzione del tempo. L'asse delle Y rappresenta la percentuale di emolisi (rispetto ai livelli pre-dose) e l'asse delle X rappresenta il tempo in giorni.

La **fig. 26** rappresenta i profili medi di concentrazione di BNJ441 nel siero-tempo in seguito a somministrazione intravenosa di una dose di 200 mg o di una dose di 400 mg a volontari sani (gruppo superiore - scala lineare; gruppo inferiore - scala log-lineare).

La **fig. 27** rappresenta i profili medi di emolisi di globuli rossi di polli-tempo in seguito a somministrazione intravenosa di placebo, di 200 mg di BNJ441

o di 400 mg di BNJ441 a volontari sani.

La **fig. 28** rappresenta la relazione tra la concentrazione di BNJ441 e la percentuale di emolisi dei globuli rossi nei polli dopo somministrazione intravenosa di BNJ441 a volontari umani sani.

La **fig. 29** rappresenta la potenza di BNJ441 in confronto a eculizumab in saggi sull'attività del complemento terminale.

La **fig. 30** rappresenta la struttura di BNJ441.

La **fig. 31** rappresenta i legami disolfuro intercatena di BNJ441.

Descrizione dettagliata

La descrizione fornisce anticorpi che sono utili, tra le altre cose, per l'inibizione del complemento terminale (per esempio l'assemblaggio e/oppure l'attività di C5b-9 TCC) e l'infiammazione mediata da anafilatossina C5a, e, quindi, per il trattamento dei disturbi associati al complemento. Gli anticorpi hanno numerose proprietà migliorate rispetto a eculizumab, comprendenti, per esempio, l'aumento della semivita nel siero di un uomo. Sebbene non intendano in alcun modo essere limitanti, gli anticorpi, i coniugati, le composizioni e le formulazioni farmaceutiche esemplificativi, ed i metodi per l'utilizzo di qualsiasi dei suddetti vengono elaborati in quanto segue

e vengono esemplificati negli esempi operativi.

Anticorpi

Gli anticorpi anti-C5 descritti in questa sede si legano al componente C5 del complemento (per esempio C5 umano) ed inibiscono la scissione di C5 in frammenti C5a e C5b. Come descritto in precedenza, tali anticorpi presentano inoltre, per esempio, proprietà farmacocinetiche migliorate rispetto ad altri anticorpi anti-C5 (per esempio eculizumab) usati per scopi terapeutici.

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-C5 descritto in questa sede comprende: (i) una CDR1 della catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi rappresentata in SEQ ID n. 1, (ii) una CDR2 della catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi rappresentata in SEQ ID n. 2, (iii) una CDR3 della catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi rappresentata in SEQ ID n. 3, (iv) una CDR1 della catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi rappresentata in SEQ ID n. 4, (v) una CDR2 della catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi rappresentata in SEQ ID n. 5, e (vi) una CDR3 della catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi rappresentata in SEQ ID n. 6, in cui almeno uno (per esempio almeno due, tre, quattro, cin-

que, sei, sette, otto, nove o 10 o più) amminoacido di (i)-(vi) è sostituito con un amminoacido differente.

Le interfacce esatte delle CDR sono state definite in modo differente a seconda dei differenti metodi. In alcune forme di realizzazione, le posizioni delle CDR o delle regioni strutturali all'interno di un dominio variabile della catena leggera o pesante possono essere come definite da Kabat et al. [(1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest". NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda, MD]. In tali casi, le CDR possono venire indicate come "CDR di Kabat" (per esempio "LCDR2 di Kabat" oppure "HCDR1 di Kabat"). In alcune forme di realizzazione, le posizioni delle CDR della regione variabile della catena leggera o pesante possono essere come definite da Chothia et al. (1989) *Nature* 342:877- 883. Pertanto, queste regioni possono venire indicate come "CDR di Chothia" (per esempio, "LCDR2 di Chothia" oppure "HCDR3 di Chothia"). In alcune forme di realizzazione, le posizioni delle CDR delle regioni variabili della catena leggera e pesante possono essere come definite da una definizione combinata di Kabat-Chothia. In tali forme di realizzazione, queste re-

gioni possono venire indicate come "CDR combinate di Kabat-Chothia". Thomas et al. [(1996) Mol Immunol 33(17/18):1389-1401] esemplificano l'identificazione delle interfacce delle CDR secondo le definizioni di Kabat e Chothia.

Qualsiasi amminoacido può essere sostituito con qualsiasi altro amminoacido. In alcune forme di realizzazione, la sostituzione è una sostituzione conservativa. Le sostituzioni conservative tipicamente comprendono sostituzioni all'interno dei seguenti gruppi: glicina ed alanina; valina, isoleucina e leucina; acido aspartico e acido glutammico; asparagina, glutammina, serina e treonina; lisina, istidina e arginina; e fenilalanina e tirosina. In alcune forme di realizzazione, uno o più amminoacidi sono sostituiti con istidina.

In alcune forme di realizzazione, almeno un amminoacido (per esempio due, tre, quattro o cinque) della CDR1 della catena pesante è sostituito con un amminoacido differente. In alcune forme di realizzazione, almeno un amminoacido (per esempio almeno due, tre, quattro o cinque) della CDR2 della catena pesante è sostituito con un amminoacido differente. In alcune forme di realizzazione, almeno un amminoacido (per esempio almeno due, tre, quattro o cinque) della

CDR3 della catena pesante è sostituito con un amminoacido differente.

In alcune forme di realizzazione, almeno un amminoacido (per esempio almeno due, tre, quattro o cinque) della CDR1 della catena leggera è sostituito con un amminoacido differente. In alcune forme di realizzazione, almeno un amminoacido (per esempio almeno due, tre, quattro o cinque) della CDR2 della catena leggera è sostituito con un amminoacido differente. In alcune forme di realizzazione, almeno un amminoacido (per esempio almeno due, tre, quattro o cinque) della CDR3 della catena leggera è sostituito con un amminoacido differente.

In alcune forme di realizzazione, una sostituzione viene effettuata in una posizione dell'amminoacido scelta dal gruppo costituito da: glicina in posizione 1 rispetto a SEQ ID n. 1, tirosina in posizione 2 rispetto a SEQ ID n. 1, isoleucina in posizione 3 rispetto a SEQ ID n. 1, fenilalanina in posizione 4 rispetto a SEQ ID n. 1, serina in posizione 5 rispetto a SEQ ID n. 1, asparagina in posizione 6 rispetto a SEQ ID n. 1, tirosina in posizione 7 rispetto a SEQ ID n. 1, triptofano in posizione 8 rispetto a SEQ ID n. 1, isoleucina in posizione 9 rispetto a SEQ ID n. 1, glutamina in posizione 10 rispetto a

SEQ ID n. 1, acido glutammico in posizione 1 rispetto a SEQ ID n. 2, isoleucina in posizione 2 rispetto a SEQ ID n. 2, leucina in posizione 3 rispetto a SEQ ID n. 2, prolina in posizione 4 rispetto a SEQ ID n. 2, glicina in posizione 5 rispetto a SEQ ID n. 2, serina in posizione 6 rispetto a SEQ ID n. 2, glicina in posizione 7 rispetto a SEQ ID n. 2, serina in posizione 8 rispetto a SEQ ID n. 2, treonina in posizione 9 rispetto a SEQ ID n. 2, acido glutammico in posizione 10 rispetto a SEQ ID n. 2, tirosina in posizione 11 rispetto a SEQ ID n. 2, treonina in posizione 12 rispetto a SEQ ID n. 2, acido glutammico in posizione 13 rispetto a SEQ ID n. 2, asparagina in posizione 14 rispetto a SEQ ID n. 2, fenilalanina in posizione 15 rispetto a SEQ ID n. 2, lisina in posizione 16 rispetto a SEQ ID n. 2, acido aspartico in posizione 17 rispetto a SEQ ID n. 2, tirosina in posizione 1 rispetto a SEQ ID n. 3, fenilalanina in posizione 2 rispetto a SEQ ID n. 3, fenilalanina in posizione 3 rispetto a SEQ ID n. 3, glicina in posizione 4 rispetto a SEQ ID n. 3, serina in posizione 5 rispetto a SEQ ID n. 3, serina in posizione 6 rispetto a SEQ ID n. 3, prolina in posizione 7 rispetto a SEQ ID n. 3, asparagina in posizione 8 rispetto a SEQ ID n. 3, triptofano in posizione 9 rispetto a SEQ ID n. 3, ti-

rosina in posizione 10 rispetto a SEQ ID n. 3, fenilalanina in posizione 11 rispetto a SEQ ID n. 3, acido aspartico in posizione 12 rispetto a SEQ ID n. 3, e valina in posizione 13 rispetto a SEQ ID n. 3.

In alcune forme di realizzazione, la glicina in posizione 31 rispetto a SEQ ID n. 8 è sostituita con un amminoacido differente. Per esempio, la glicina sottolineata in CDR1 della catena leggera di eculizumab può essere sostituita con un amminoacido differente: GASENIYGALN (SEQ ID n. 4). La sostituzione può essere una istidina per glicina, vale a dire GASENIY-HALN (SEQ ID n. 17).

In alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-C5 descritto in questa sede comprende una sostituzione di un amminoacido in una posizione dell'amminoacido scelta dal gruppo costituito da: glicina alla posizione 26 rispetto a SEQ ID n. 7, tirosina alla posizione 27 rispetto a SEQ ID n. 7, glicina alla posizione 26 rispetto a SEQ ID n. 7, isoleucina alla posizione 28 rispetto a SEQ ID n. 7, fenilalanina alla posizione 29 rispetto a SEQ ID n. 7, serina alla posizione 30 rispetto a SEQ ID n. 7, asparagina alla posizione 31 rispetto a SEQ ID n. 7, tirosina alla posizione 32 rispetto a SEQ ID n. 7, triptofano alla posizione 33 rispetto a SEQ ID n. 7, isoleucina

alla posizione 34 rispetto a SEQ ID n. 7, glutammina
alla posizione 35 rispetto a SEQ ID n. 7, acido glu-
tammico alla posizione 50 rispetto a SEQ ID n. 7,
isoleucina alla posizione 51 rispetto a SEQ ID n. 7,
leucina alla posizione 52 rispetto a SEQ ID n. 7,
prolina alla posizione 53 rispetto a SEQ ID n. 7,
glicina alla posizione 54 rispetto a SEQ ID n. 7, se-
rina alla posizione 55 rispetto a SEQ ID n. 7, glici-
na alla posizione 56 rispetto a SEQ ID n. 7, serina
alla posizione 57 rispetto a SEQ ID n. 7, treonina
alla posizione 58 rispetto a SEQ ID n. 7, acido glu-
tammico alla posizione 59 rispetto a SEQ ID n. 7, ti-
rosina alla posizione 60 rispetto a SEQ ID n. 7,
treonina alla posizione 61 rispetto a SEQ ID n. 7,
acido glutammico alla posizione 62 rispetto a SEQ ID
n. 7, asparagina alla posizione 63 rispetto a SEQ ID
n. 7, fenilalanina alla posizione 64 rispetto a SEQ
ID n. 7, lisina alla posizione 65 rispetto a SEQ ID
n. 7, acido aspartico alla posizione 66 rispetto a
SEQ ID n. 7, tirosina alla posizione 99 rispetto a
SEQ ID n. 7, fenilalanina alla posizione 100 rispetto
a SEQ ID n. 7, fenilalanina alla posizione 101 ri-
spetto a SEQ ID n. 7, glicina alla posizione 102 ri-
spetto a SEQ ID n. 7, serina alla posizione 103 ri-
spetto a SEQ ID n. 7, serina alla posizione 104 ri-

rispetto a SEQ ID n. 7, prolina alla posizione 105 rispetto a SEQ ID n. 7, asparagina alla posizione 106 rispetto a SEQ ID n. 7, triptofano alla posizione 107 rispetto a SEQ ID n. 7, tirosina alla posizione 108 rispetto a SEQ ID n. 7, fenilalanina alla posizione 109 rispetto a SEQ ID n. 7, acido aspartico alla posizione 110 rispetto a SEQ ID n. 7e valina alla posizione 111 rispetto a SEQ ID n. 7. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-C5 comprende due o più (per esempio almeno due, tre, quattro, cinque, sei, sette, otto, nove oppure 10 o più) di qualsiasi delle suddette sostituzioni ed in qualsiasi combinazione.

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-C5 comprende almeno una sostituzione che soddisfa i seguenti criteri rispetto a eculizumab:

(1) una variazione massima per cinetiche di associazione a pH 7,4 di uno spostamento di fase del picco inferiore al 33% a 800 secondi in confronto allo spostamento di fase del picco medio a 800 secondi osservato per eculizumab;

(2) una variazione massima per cinetiche di dissociazione a pH 7,4 di una riduzione non superiore a 3 volte nello spostamento della fase di picco in 800 secondi in confronto allo spostamento della fase del

picco medio a 800 secondi osservata per eculizumab; e

(3) una variazione minima per cinetiche di dissociazione a pH 6,0 di una riduzione di almeno 3 volte dello spostamento della fase del picco in 800 secondi in confronto allo spostamento della fase del picco medio a 800 secondi osservata per eculizumab.

Per esempio, rispetto al criterio (1) precedente, se lo spostamento della fase di picco medio dopo 800 secondi di associazione con eculizumab è approssimativamente di 0,75 nm, un anticorpo di prova che ha uno spostamento della fase inferiore a 0,5 nm (per esempio riprodotto due o più volte) non soddisferebbe i suddetti criteri. Al contrario, un anticorpo anti-C5 con uno spostamento della fase di picco maggiore di 0,5 nm a 800 secondi soddisfa questo primo criterio. Tali sostituzioni danno origine ad anticorpi anti-C5 che deviano solamente dalle k_a and k_d di eculizumab a pH di 7,4 ad un grado minore, ma deviano dalla k_d di eculizumab a pH 6,0 in modo più significativo.

In alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-C5 descritto in questa sede comprende almeno una sostituzione di amminoacido (per esempio almeno due, tre o quattro) ad una posizione dell'amminoacido scelta dal gruppo costituito da: glicina alla posi-

zione 31 rispetto a SEQ ID n. 8, leucina alla posizione 33 rispetto a SEQ ID n. 8, valina alla posizione 91 rispetto a SEQ ID n. 8, e treonina alla posizione 94 rispetto a SEQ ID n. 8. In alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-C5 descritto in questa sede comprende almeno una sostituzione di amminoacidi (per esempio due, tre, quattro o cinque) in una posizione dell'amminoacido scelta dal gruppo costituito da: tirosina alla posizione 27 rispetto a SEQ ID n. 7, isoleucina alla posizione 34 rispetto a SEQ ID n. 7, leucina alla posizione 52 rispetto a SEQ ID n. 7 e serina alla posizione 57 rispetto a SEQ ID n. 7.

In alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-C5 descritto in questa sede contiene nella sua regione variabile della catena leggera almeno una sostituzione scelta da quanto segue: glicina alla posizione 31 rispetto a SEQ ID n. 8, leucina alla posizione 33 rispetto a SEQ ID n. 8, valina alla posizione 91 rispetto a SEQ ID n. 8 e treonina alla posizione 94 rispetto a SEQ ID n. 8. Si veda la tabella 1 seguente. In alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-C5 descritto in questa sede contiene nella sua regione variabile della catena pesante almeno una sostituzione scelta tra quanto segue: tirosina alla

posizione 27 rispetto a SEQ ID n. 7, isoleucina alla posizione 34 rispetto a SEQ ID n. 7, leucina alla posizione 52 rispetto a SEQ ID n. 7 e serina alla posizione 57 rispetto a SEQ ID n. 7. Si veda la tabella 1 seguente.

In alcune forme di realizzazione, un anticorpo comprende almeno due sostituzioni di amminoacidi (per esempio almeno tre, quattro, cinque, sei, sette, otto, nove oppure 10) rispetto al gruppo di CDR definito dalle SEQ ID numeri 1-6. Quindi, in alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-C5 descritto in questa sede comprende due o più sostituzioni nelle combinazioni alle posizioni di amminoacidi esposte nella tabella 1.

Tabella 1. Combinazioni di sostituzioni di amminoacidi

Posizione degli amminoacidi/ Ab Cmb N.:	<u>Sostituzioni all'interno delle CDR della regione variabile della catena leggera di Eculizumab (rispetto alla SEQ ID n. 8)</u>				<u>Sostituzioni all'interno delle CDR della regione variabile della catena pesante di Eculizumab (rispetto alla SEQ ID n. 7)</u>			
	G31	L33	V91	T94	Y27	I34	L52	S57
1	•				•			
2	•					•		
3	•						•	
4	•							•

	<u>Sostituzioni all'interno delle CDR della regione variabile a catena leggera di Eculizumab (rispetto alla SEQ ID n. 8)</u>				<u>Sostituzioni all'interno delle CDR della regione variabile a catenapesante di Eculizumab (rispetto alla SEQ ID n. 7)</u>			
Posizione degli amminoacidi/ Ab Cmb N.:	G31	L33	V91	T94	Y27	I34	L52	S57
5		•			•			
6		•				•		
7		•					•	
8		•						•
9			•		•			
10			•			•		
11			•				•	
12			•					•
13	•	•			•	•		
14	•	•			•		•	
15	•	•			•			•
16	•	•				•	•	
17	•	•				•		•

	<u>Sostituzioni all'interno delle CDR della regione variabile a catena leggera di Eculizumab (rispetto alla SEQ ID n. 8)</u>				<u>Sostituzioni all'interno delle CDR della regione variabile a catenapesante di Eculizumab (rispetto alla SEQ ID n. 7)</u>			
Posizione degli amminoacidi/ Ab Cmb N.:	G31	L33	V91	T94	Y27	I34	L52	S57
18	•	•					•	•
19	•		•		•	•		
20	•		•		•		•	
21	•		•		•			•
22	•		•			•	•	
23	•		•			•		•
24	•		•				•	•
25		•	•		•	•		
26		•	•		•		•	
27		•	•		•			•
28		•	•			•	•	
29		•	•			•		•
30		•	•				•	•

	<u>Sostituzioni all'interno delle CDR della regione variabile a catena leggera di Eculizumab (rispetto alla SEQ ID n. 8)</u>				<u>Sostituzioni all'interno delle CDR della regione variabile a catenapesante di Eculizumab (rispetto alla SEQ ID n. 7)</u>			
Posizione degli amminoacidi/ Ab Cmb N.:	G31	L33	V91	T94	Y27	I34	L52	S57
31	•	•			•			
32	•	•				•		
33	•	•					•	
34	•	•						•
35	•		•		•			
36	•		•			•		
37	•		•				•	
38	•		•					•
39		•	•		•			
40		•	•			•		
41		•	•				•	
42		•	•					•
43	•				•	•		

	<u>Sostituzioni all'interno delle CDR della regione variabile a catena leggera di Eculizumab (rispetto alla SEQ ID n. 8)</u>				<u>Sostituzioni all'interno delle CDR della regione variabile a catenapesante di Eculizumab (rispetto alla SEQ ID n. 7)</u>			
Posizione degli amminoacidi/ Ab Cmb N.:	G31	L33	V91	T94	Y27	I34	L52	S57
44		•			•	•		
45			•		•	•		
46	•				•		•	
47		•			•		•	
48			•		•		•	
49	•				•			•
50		•			•			•
51			•		•			•
52	•					•	•	
53		•				•	•	
54			•			•	•	
55	•					•		•
56		•				•		•

	<u>Sostituzioni all'interno delle CDR della regione variabile a catena leggera di Eculizumab (rispetto alla SEQ ID n. 8)</u>				<u>Sostituzioni all'interno delle CDR della regione variabile a catenapesante di Eculizumab (rispetto alla SEQ ID n. 7)</u>			
Posizione degli amminoacidi/ Ab Cmb N.:	G31	L33	V91	T94	Y27	I34	L52	S57
57			•			•		•
58	•						•	•
59		•					•	•
60			•				•	•
61	•	•	•		•			
62	•	•	•			•		
63	•	•	•				•	
64	•	•	•					•
65	•				•	•	•	•
66		•			•	•	•	•
67			•		•	•	•	•
68	•				•	•	•	
69	•				•	•		•

	<u>Sostituzioni all'interno delle CDR della regione variabile a catena leggera di Eculizumab (rispetto alla SEQ ID n. 8)</u>				<u>Sostituzioni all'interno delle CDR della regione variabile a catenapesante di Eculizumab (rispetto alla SEQ ID n. 7)</u>			
Posizione degli amminoacidi/ Ab Cmb N.:	G31	L33	V91	T94	Y27	I34	L52	S57
70	•				•		•	•
71	•					•	•	•
72				•	•	•	•	
73				•	•	•		•
74				•	•		•	•
75				•		•	•	•
76	•	•	•		•	•	•	•

“•” indica quale degli amminoacidi è sostituito in un dato anticorpo. Per esempio, Ab Cmb n. 76 definisce un anticorpo comprendente le sei CDR di eculizumab, in cui le CDR della catena leggera comprendono sostituzioni alle posizioni 31, 33 e 91, rispetto a SEQ ID n. 8, e le CDR della catena pesante comprendono sostituzioni alle posizioni 27, 34, 52 e 57 rispetto a SEQ ID n. 7.

“Ab Comb n.” si riferisce ad una designazione data ad

un particolare anticorpi anti-C5 variante indicato nella tabella.

Per essere chiari, gli anticorpi anti-C5 variabili indicati nella tabella 1 devono solo avere le sequenze di amminoacidi delle sei (6) CDR di eculizumab in cui vengono effettuate le date sostituzioni di amminoacidi indicate. Gli anticorpi variabili possono comprendere opzionalmente le regioni strutturali di SEQ ID n. 7 oppure SEQ ID n. 8.

Le sostituzioni descritte nella tabella 1 possono essere per qualsiasi amminoacido che sia diverso dal residuo di amminoacidi indicato. In alcune forme di realizzazione, l'amminoacido diverso è istidina.

In alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-C5 descritto in questa sede comprende una sostituzione effettuata ad una posizione dell'amminoacido scelta dal gruppo costituito da: tirosina alla posizione 27 rispetto a SEQ ID n. 7, isoleucina alla posizione 34 rispetto a SEQ ID n. 7, leucina alla posizione 52 rispetto a SEQ ID n. 7 e serina alla posizione 57 rispetto a SEQ ID n. 7. In alcune forme di realizzazione, sia la tirosina alla posizione 27 rispetto a SEQ ID n. 7 sia la leucina alla posizione 52 rispetto a SEQ ID n. 7 sono ciascuna sostituita con un amminoacido diverso. In alcune forme di realizza-

zione, sia l'isoleucina alla posizione 34 rispetto a SEQ ID n. 7 sia la serina alla posizione 57 rispetto a SEQ ID n. 7 sono ciascuna sostituita con un amminoacido diverso. In alcune forme di realizzazione, sia l'isoleucina alla posizione 34 rispetto a SEQ ID n. 7 sia la leucina alla posizione 52 rispetto a SEQ ID n. 7 sono ciascuna sostituita con un amminoacido diverso. In alcune forme di realizzazione, sia la tirosina alla posizione 27 rispetto a SEQ ID n. 7 sia la serina alla posizione 57 rispetto a SEQ ID n. 7 sono ciascuna sostituita con un amminoacido diverso. In alcune forme di realizzazione di qualsiasi degli anticorpi anti-C5 descritti in questa sede, l'amminoacido diverso è un'istidina. Per esempio, la tirosina alla posizione 27 e la serina alla posizione 57 possono essere ciascuno sostituiti con istidina.

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-C5 descritto in questa sede comprende una CDR1 della catena pesante comprendente, oppure costituita dalla seguente sequenza di amminoacidi: GHIIFS^{NY}W^{IQ} (SEQ ID n. 23). In alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-C5 descritto in questa sede comprende una CDR2 della catena pesante che comprende, oppure è costituita dalla seguente sequenza di amminoacidi: EILPGSGHTEY^{TEN}FKD (SEQ ID n. 19). In alcune forme di

realizzazione, un anticorpo anti-C5 descritto in questa sede comprende una regione variabile della catena pesante comprendente la seguente sequenza di amminoacidi: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGHIFSNYWIQWVR-QAPGQGLEWMGEILPGSGHTEYTENFKDRVMTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE-DTAVYYCARYFFGSSPNWYFDVWGQG TLVTVSS (SEQ ID n. 12).

In alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-C5 descritto in questa sede comprende una regione variabile della catena leggera comprendente la seguente sequenza di amminoacidi: DIQMTQSPSSLSASV-GDRVITTCGASENIYGALNWIYQQKPGKAPKLLIYGATNLDGVPSRFSGSGS-GTDFTLTISLQPEDFATYYCQNVLNTPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID n. 8).

Un anticorpo anti-C5 descritto in questa sede può legarsi a C5 a pH 7,4 e a 25°C (e, diversamente, in condizioni fisiologiche) con una costante di dissociazione per l'affinità (K_D) che è almeno di 0,1 (per esempio almeno 0,15, 0,175, 0,2, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475, 0,5, 0,525, 0,55, 0,575, 0,6, 0,625, 0,65, 0,675, 0,7, 0,725, 0,75, 0,775, 0,8, 0,825, 0,85, 0,875, 0,9, 0,925, 0,95, oppure 0,975) nM. In alcune forme di realizzazione, la K_D dell'anticorpo anti-C5 non è maggiore di 1 (per esempio non è maggiore di 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, oppure 0,2) nM.

In alcune forme di realizzazione di qualsiasi anticorpo anti-C5 descritto in questa sede, $[(K_D \text{ dell'anticorpo per C5 a pH } 6,0 \text{ a } 25^\circ\text{C}) / (K_D \text{ dell'anticorpo per C5 a pH } 7,4 \text{ a } 25^\circ\text{C})]$ è maggiore di 21 (per esempio maggiore di 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500 oppure 8000).

Metodi per determinare se un anticorpo si lega ad un antigene di proteina e/oppure l'affinità di un anticorpo con l'antigene proteina sono noti nella tecnica. Per esempio, il legame di un anticorpo con un antigene proteina può venire rilevato e/oppure quantificato usando una varietà di tecniche come, ma non limitate a questi, i metodi Western blot, dot blot, risonanza plasmonica di superficie (SPR) (per esempio BIAcore system; Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.), oppure saggio immunoassorbente legato ad un enzima (ELISA). Si vedano, per esempio, Harlow and Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Benny K. C. Lo

(2004) "Antibody Engineering: Methods and Protocols", Humana Press (ISBN: 1588290921); Borrebaek (1992) "Antibody Engineering, A Practical Guide", W.H. Freeman and Co., NY; Borrebaek (1995) "Antibody Engineering", 2nd Edition, Oxford University Press, NY, Oxford; Johne et al. (1993) J Immunol Meth 160:191-198; Jonsson et al. (1993) Ann Biol Clin 51:19-26; e Jonsson et al. (1991) Biotechniques 11:620-627. Inoltre, i metodi per misurare l'affinità (per esempio costanti di dissociazione ed associazione) sono esposti negli esempi operativi.

Il termine usato in questa sede " k_a " si riferisce alla costante di velocità per associazione di un anticorpo con un antigene. Il termine " k_d " si riferisce alla costante di velocità per dissociazione di un anticorpo dal complesso anticorpo/antigene. Ed il termine " K_D " si riferisce alla costante di dissociazione in equilibrio dell'interazione anticorpo/antigene. La costante di dissociazione in equilibrio viene dedotta dal rapporto delle costanti della velocità cinetica, $K_D = k_a/k_d$. Tali determinazioni vengono preferibilmente misurate a 25°C oppure 37°C (si vedano gli esempi operativi). Per esempio, le cinetiche dell'anticorpo che si lega a C5 umano possono venire determinate a pH 8,0, 7,4, 7,0, 6,5 e 6,0 attraverso

la risonanza plasmonica di superficie (SPR) su uno strumento BIAcore 3000 che usa un metodo di cattura anti-Fc per immobilizzare l'anticorpo.

L'anticorpo anti-C5 descritto in questa sede può avere attività nel bloccare la generazione o l'attività dei frammenti attivi C5a e/oppure C5b di una proteina C5 (per esempio la proteina C5 umana). Attraverso questo effetto di bloccaggio, gli anticorpi inibiscono, per esempio, gli effetti pro-infiammatori di C5a e la generazione del complesso di attacco della membrana C5b-9 (MAC) sulla superficie di una cellula.

Metodi per determinare se un particolare anticorpo descritto in questa sede inibisca la scissione di C5 sono noti nella tecnica. L'inibizione del componente del complemento umano C5 può ridurre la capacità di lisi cellulare del complemento nei fluidi corporei di un soggetto. Tali riduzioni della capacità di lisi cellulare del complemento presente nel fluido (fluidi) corporeo può venire misurata mediante metodi ben noti nella tecnica, come, per esempio, mediante un saggio emolitico convenzionale come il saggio di emolisi descritto da Kabat and Mayer (eds.), "Experimental Immunochemistry, 2nd Edition", 135-240, Springfield, IL, CC Thomas (1961), pagine 135-139,

oppure una variazione convenzionale di quel saggio come il metodo di emolisi degli eritrociti dei polli descritto, per esempio in Hillmen et al. (2004) *N Engl J Med* 350(6):552. Metodi per determinare se un composto candidato inibisca la scissione di C5 umano in forme C5a e C5b sono noti nella tecnica e vengono descritti, per esempio, in Moongkarndi et al. (1982) *Immunobiol* 162:397; Moongkarndi et al. (1983) *Immunobiol* 165:323; Isenman et al. (1980) *J Immunol* 124(1):326-31; Thomas et al. (1996) *Mol Immunol* 33(17-18):1389-401; and Evans et al. (1995) *Mol Immunol* 32(16):1183-95. Per esempio, la concentrazione e/oppure l'attività fisiologica di C5a e C5b in un fluido corporeo possono venire misurate mediante metodi ben noti nella tecnica. Metodi per la misurazione della concentrazione o dell'attività di C5a comprendono, per esempio, saggi di chemiotassi, RIA oppure ELISA (si vedano, per esempio, Ward and Zvaifler (1971) *J Clin Invest* 50(3):606-16 and Wurzner et al. (1991) *Complement Inflamm* 8:328-340). Per C5b, possono venire usati saggi emolitici oppure saggi per 5b-9 solubile descritti in questa sede. Possono venire anche usati altri saggi noti nella tecnica. Usando saggi di questi tipi o di altri tipi adatti, si possono selezionare agenti candidati in grado di inibire

il componente C5 del complemento umano.

Possono venire usate tecniche immunologiche come, ma non limitate a queste, ELISA, per misurare la concentrazione di proteine di C5 e/oppure i suoi prodotti suddivisi per determinare la capacità di un anticorpo anti-C5 di inibire la conversione di C5 in prodotti biologicamente attivi. In alcune forme di realizzazione, viene misurata la generazione di C5a. In alcune forme di realizzazione, anticorpi specifici per C5b-9 neoepitopo vengono usati per rilevare la formazione del complemento terminale.

Possono venire usati saggi emolitici per determinare l'attività inibitoria di un anticorpo anti-C5 sull'attivazione del complemento. Per determinare l'effetto di un anticorpo anti-C5 sull'emolisi mediata dal percorso del complemento classico in una soluzione di prova nel siero in vitro, per esempio, vengono usati come cellule bersaglio eritrociti di pecora rivestiti con emolisina oppure eritrociti di pollo sensibilizzati con anticorpi anti-eritrociti di pollo. La percentuale di lisi viene normalizzata considerando il 100% della lisi uguale alla lisi che si verifica in assenza dell'inibitore. In alcune forme di realizzazione, il percorso del complemento classico viene attivato da un anticorpo IgM umano, per

esempio come quello utilizzato nel kit del complemento del percorso classico Wieslab® (Wieslab® COMPL CP310, Euro-Diagnostica, Sweden). In breve, il siero di prova viene incubato con un anticorpo anti-C5 in presenza di un anticorpo IgM umano. La quantità di C5b-9 che si genera viene misurata portando a contatto la miscela con un anticorpo anti-C5b-9 coniugato con un enzima ed un substrato fluorogenico e misurando l'assorbanza ad una lunghezza d'onda appropriata. Come controllo, il siero di prova viene incubato in assenza dell'anticorpo anti-C5. In alcune forme di realizzazione, il siero di prova è un siero privo di C5 ricostituito con un polipeptide di C5.

Per determinare l'effetto di anticorpo anti-C5 sull'emolisi mediata dal percorso alternativo, vengono usati eritrociti di porcellini d'India o di coniglio non sensibilizzati come cellule bersaglio. In alcune forme di realizzazione, la soluzione di prova nel siero è ricostituita nel siero privo di C5 con un polipeptide C5. La percentuale di lisi viene normalizzata considerando il 100% di lisi uguale alla lisi che si verifica in assenza dell'inibitore. In alcune forme di realizzazione, il percorso del complemento alternativo viene attivato mediante molecole di lipopolisaccaride, per esempio come quelle utilizzate nel

kit del complemento del percorso alternativo Wieslab[®] (Wieslab[®] COMPL AP330, Euro-Diagnostica, Sweden). In breve, il siero di prova viene incubato con un anticorpo anti-C5 in presenza di lipopolisaccaride. La quantità di C5b-9 che si genera viene misurata portando a contatto la miscela con un anticorpo anti-C5b-9 coniugato con un enzima ed un substrato fluorogenico, e misurando la fluorescenza alla lunghezza d'onda appropriata. Come controllo, il siero di prova viene incubato in assenza dell'anticorpo anti-C5.

In alcune forme di realizzazione, l'attività di C5, oppure la sua inibizione, viene quantificata usando un saggio di equivalenti di CH50. Il saggio di CH50eq è un metodo per la misurazione dell'attività totale del complemento classico nel siero. Questa prova è un saggio litico, che utilizza eritrociti sensibilizzati con anticorpi come attivatori del percorso del complemento classico e varie diluizioni del siero di prova per determinare la quantità richiesta per ottenere una lisi del 50% (CH50). La percentuale di emolisi può venire determinata, per esempio, usando uno spettrofotometro. Il saggio di CH50eq fornisce una misura indiretta della formazione del complesso del complemento terminale (TCC), poiché i TCC stessi sono indirettamente responsabili dell'emolisi che

viene misurata.

Il saggio è ben noto e comunemente realizzato dagli esperti del settore. In breve, per attivare il percorso del complemento classico, campioni di siero non diluito (per esempio campioni di siero umano ricostituito) vengono aggiunti a pozzetti per microsaggi contenenti gli eritrociti sensibilizzati con gli anticorpi, generando in tal modo TCC. Quindi, i sieri attivati vengono diluiti in pozzetti per microsaggi, che vengono rivestiti con un reagente di cattura (per esempio un anticorpo che si lega ad uno o più componenti del TCC). Il TCC presente nei campioni attivati si lega agli anticorpi monoclonali che rivestono la superficie dei pozzetti per microsaggio. I pozzetti vengono lavati ed a ciascun pozzetto viene aggiunto un reagente di rilevamento che viene marcato in modo rilevabile e riconosce il TCC legato. Il marcatore rilevabile può essere, per esempio, un marcatore fluorescente oppure un marcatore enzimatico. I risultati del saggio vengono espressi in equivalenti di unità di CH50 per millilitro (CH50 U eq/ml).

L'inibizione, per esempio, quando si riferisce all'attività del complemento terminale, comprende almeno una diminuzione del 5% (per esempio almeno del 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55,

oppure 60%) dell'attività del complemento terminale in un saggio emolitico per esempio, oppure in un saggio di CH50eq in confronto all'effetto di un anticorpo di controllo (oppure un suo frammento legante l'antigene) in condizioni simili e ad una concentrazione equimolare. Un'inibizione sostanziale usata in questa sede si riferisce all'inibizione di una data attività (per esempio attività del complemento terminale) almeno del 40% (per esempio almeno del 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, oppure 95% o superiore). In alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-C5 descritto in questa sede contiene una o più sostituzioni di amminoacidi rispetto alle CDR di eculizumab (vale a dire SEQ ID numeri 1-6), ma mantiene almeno il 30% (per esempio almeno il 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 oppure 95%) dell'attività inibitoria del complemento di eculizumab in un saggio emolitico oppure in un saggio di CH50eq.

Un anticorpo anti-C5 descritto in questa sede ha una semi-vita nel siero dell'uomo che è almeno di 20 giorni (per esempio almeno di 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 oppure 36 giorni). Metodi per la misurazione della semi-vita nel siero

di un anticorpo sono noti nella tecnica e vengono esemplificati negli esempi operativi. Si vedano, per esempio, Dall'Acqua et al. (2006) J Biol Chem 281: 23514-23524; Hinton et al. (2004) J Biol Chem 279:6213-6216; Hinton et al. (2006) J Immunol 176:346-356; e Petkova et al. (2006) Int Immunol 18(12):1759-69. In alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-C5 descritto in questa sede ha una semi-vita nel siero che è almeno del 20% maggiore (per esempio almeno del 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400, 500% maggiore) rispetto alla semi-vita nel siero di eculizumab, per esempio quando misurata in uno dei sistemi di modelli di topi descritti negli esempi operativi (per esempio il topo privo di C5 NOD/scid oppure in un sistema di modelli di topi transgenici hFcRn).

Modifiche alla regione di Fc

Un anticorpo anti-C5 descritto in questa sede può comprendere, in alcune forme di realizzazione, una variante della regione costante di Fc umano che si lega al recettore di Fc neonatale umano (FcRn) con maggiore affinità rispetto a quello della regione costante di Fc umano nativo da cui è stata derivata la variante della regione costante di Fc umano. Per

esempio, la regione costante di Fc può comprendere una o più sostituzioni di amminoacidi (per esempio due, tre, quattro, cinque, sei, sette, oppure otto o più) rispetto alla regione costante di Fc umano nativa da cui è stata derivata la variante della regione costante di Fc umano. Le sostituzioni possono aumentare l'affinità di legame di un anticorpo di IgG contenente la variante della regione costante di Fc con FcRn a pH 6,0, mentre si mantiene la dipendenza dell'interazione dal pH. Si vedano, per esempio, Hinton et al. (2004) J Biol Chem 279:6213-6216 e Datta-Mannan et al. (2007) Drug Metab Dispos 35: 1-9. Metodi per testare se una o più sostituzioni nella regione costante di Fc di un anticorpo aumentano l'affinità della regione costante di Fc per FcRn a pH 6,0 (mentre si mantiene la dipendenza dell'interazione dal pH) sono note nella tecnica ed esemplificate negli esempi operativi. Si vedano per esempio, Datta-Mannan et al. (2007) J Biol Chem 282(3): 1709-1717; pubblicazione internazionale n. WO 98/23289; pubblicazione internazionale n. WO 97/34631; e brevetto U.S. n. 6.277.375.

Le sostituzioni che migliorano l'affinità di legame di una regione costante di un anticorpo Fc per FcRn sono note nella tecnica e comprendono, per esem-

pio, (1) la tripla sostituzione M252Y/S254T/T256E descritta da Dall'Acqua et al. (2006) J Biol Chem 281:23514-23524; (2) le sostituzioni M428L oppure T250Q/M428L descritte in Hinton et al. (2004) J Biol Chem 279:6213-6216 e Hinton et al. (2006) J Immunol 176:346-356; e (3) le sostituzioni N434A oppure T307/E380A/N434A descritte in Petkova et al. (2006) Int Immunol 18(12): 1759-69. Gli altri accoppiamenti di sostituzioni: P257I/Q311I, P257I/N434H e D376V/N434H vengono descritti per esempio in Datta-Mannan et al. (2007) J Biol Chem 282(3):1709-1717.

In alcune forme di realizzazione, la variante della regione costante ha una sostituzione al residuo 255 di amminoacidi di UE per la valina. In alcune forme di realizzazione, la variante della regione costante ha una sostituzione al residuo di amminoacidi UE 309 per asparagina. In alcune forme di realizzazione, la variante della regione costante ha una sostituzione al residuo 312 di amminoacidi di UE per isoleucina. In alcune forme di realizzazione, la variante della regione costante ha una sostituzione al residuo di amminoacidi dell'UE 386.

In alcune forme di realizzazione, la variante della regione costante di Fc non comprende più di 30 (per esempio non più di 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23,

22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, nove, otto, sette, sei, cinque, quattro, tre oppure due) sostituzioni, inserzioni o delezioni di amminoacidi rispetto alla regione costante nativa da cui essa deriva. In alcune forme di realizzazione, la variante della regione costante di Fc comprende una o più sostituzioni di amminoacidi scelte dal gruppo costituito da M252Y, S254T, T256E, N434S, M428L, V259I, T250I e V308F. In alcune forme di realizzazione, la variante della regione costante di Fc umano comprende una metionina alla posizione 428 ed una asparagina alla posizione 434, ciascuna nella numerazione UE. In alcune forme di realizzazione, la variante della regione costante di Fc comprende una doppia sostituzione 428L/434S come descritto, per esempio, nel brevetto U.S. n. 8.088.376.

In alcune forme di realizzazione, la variante della regione costante comprende una sostituzione alla posizione degli amminoacidi 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434 oppure 436 (numerazione dell'UE) rispetto alla regione costante di Fc umano nativo. In alcune forme di realiz-

zazione, la sostituzione viene scelta dal gruppo costituito da: metionina per glicina alla posizione 237, alanina per prolina alla posizione 238, lisina per serina alla posizione 239, isoleucina per lisina alla posizione 248, alanina, fenilalanina, isoleucina, metionina, glutammina, serina, valina, triptofano oppure tirosina per treonina alla posizione 250; fenilalanina, triptofano oppure tirosina per metionina alla posizione 252; treonina per serina alla posizione 254, acido glutammico per arginina alla posizione 255; acido aspartico, acido glutammico oppure glutammina per treonina alla posizione 256, alanina, glicina, isoleucina, metionina, asparagina, serina, treonina oppure valina per prolina alla posizione 257, istidina per acido glutammico alla posizione 258; alanina per acido aspartico alla posizione 265; fenilalanina per acido aspartico alla posizione 270; alanina oppure acido glutammico per asparagina alla posizione 286; istidina per treonina alla posizione 289; alanina per asparagina alla posizione 297; glicina per serina alla posizione 298; alanina per valina alla posizione 303; alanina per valina alla posizione 305; alanina, acido aspartico, fenilalanina; glicina, istidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutammina, arginina,

serina, valina, triptofano, oppure tirosina per treonina alla posizione 307; alanina, fenilalanina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, glutammina oppure treonina per valina alla posizione 308; alanina, acido aspartico, acido glutammico, prolina oppure arginina per leucina o valina alla posizione 309; alanina, istidina oppure isoleucina per glutammina alla posizione 311; alanina oppure istidina per acido aspartico alla posizione 312; lisina o arginina per leucina alla posizione 314; alanina o istidina per asparagina alla posizione 315; alanina per lisina alla posizione 317; glicina per asparagina alla posizione 325; valina per isoleucina alla posizione 332; leucina per lisina alla posizione 334; istidina per lisina alla posizione 360; alanina per acido aspartico alla posizione 376; alanina per acido glutammico alla posizione 380; alanina per acido glutammico alla posizione 382; alanina per asparagina o serina alla posizione 384; acido aspartico o istidina per glicina alla posizione 385; prolina per glutammina alla posizione 386; acido glutammico per prolina alla posizione 387; alanina o serina per asparagina alla posizione 389; alanina per serina alla posizione 424; alanina, acido aspartico, fenilalanina, glicina, istidina, isoleucina, lisina leucina, asparagina, prolina, glu-

tammina, serina, treonina, valina, triptofano oppure tirosina per metionina alla posizione 428; lisina per istidina alla posizione 433; alanina, fenilalanina, istidina, serina, triptofano oppure tirosina per asparagina alla posizione 434; e istidina per tirosina o fenilalanina alla posizione 436, tutte secondo la numerazione dell'UE.

Un anticorpo anti-C5 descritto in questa sede può comprendere, in certe forme di realizzazione, un polipeptide a catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi rappresentata in SEQ ID n. 12 o 14 e/oppure un polipeptide a catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi rappresentata nella SEQ ID n. 8 oppure 11.

Metodi per la produzione degli anticorpi anti-C5 e dei loro frammenti leganti l'antigene

La descrizione si riferisce inoltre alla produzione di qualsiasi degli anticorpi anti-C5 o dei loro frammenti leganti l'antigene descritti in questa sede. In alcune forme di realizzazione, i metodi per la preparazione di un anticorpo descritto in questa sede possono comprendere l'immunizzazione di un soggetto (per esempio un mammifero non umano) con un immunogeno appropriato. Immunogeni adatti per la generazione di qualsiasi degli anticorpi descritti in questa sede

vengono esposti in questa sede. Per esempio, per generare un anticorpo che si lega a C5, un esperto del settore può immunizzare un soggetto adatto (per esempio un mammifero non umano come un ratto, un topo, un gerbillo, un criceto, un cane, un gatto, un maiale, una capra, un cavallo oppure un primate non umano) con un polipeptide di C5 a lunghezza completa, come un polipeptide di C5 umano a lunghezza completa. In alcune forme di realizzazione, il mammifero non umano è privo di C5, per esempio un topo privo di C5 descritto, per esempio, in Levy and Ladda (1971) *Nat New Biol* 229(2):51-52; Crocker et al. (1974) *J Clin Pathol* 27(2): 122-124; Wetsel et al. (1990) *J Biol Chem* 265:2435-2440; and Jungi and Pepys (1981) *Immunology* 43(2):271-279.

Un soggetto adatto (per esempio un mammifero non umano) può venire immunizzato con l'antigene appropriato unitamente ad immunizzazioni successive di richiamo, un numero di volte sufficiente a stimolare la produzione di un anticorpo da parte del mammifero. L'immunogeno può venire somministrato ad un soggetto (per esempio un mammifero non umano) con un adiuvante. Adjuvanti utili nella produzione di un anticorpo in un soggetto comprendono, ma non sono limitati a questi, adjuvanti a base di proteine; adjuvanti bat-

terici, per esempio batteri interi (BCG, *Corynebacterium parvum* oppure *Salmonella minnesota*) e componenti batterici comprendenti scheletro delle pareti cellulari, trealosio dimicolato, monofosforil-lipide A, residuo estraibile di metanolo (MER) del bacillo tubercolo, adiuvante di Freund completo o incompleto; adiuvanti virali; adiuvanti chimici, per esempio idrossido di alluminio e iodoacetato e colesteril-emisuccinato. Altri adiuvanti che possono venire usati nei metodi per indurre una risposta immunitaria comprendono, per esempio, la tossina del colera e le proteine del parapoxvirus. Si vedano anche Bieg et al. (1999) *Autoimmunity* 31(1):15-24. Si vedano inoltre, per esempio, Lodmell et al. (2000) *Vaccine* 18:1059-1066; Johnson et al. (1999) *J Med Chem* 42:4640-4649; Baldrige et al. (1999) *Methods* 19:103-107; e Gupta et al. (1995) *Vaccine* 13(14):1263-1276.

In alcune forme di realizzazione, i metodi comprendono la preparazione di una linea cellulare di ibridoma che secerne un anticorpo monoclonale che si lega all'immunogeno. Per esempio, un mammifero adatto come un topo da laboratorio viene immunizzato con un polipeptide di C5, come descritto in precedenza. Le cellule che producono gli anticorpi (per esempio le cellule B della milza) del mammifero immunizzato pos-

sono venire isolate da due a quattro giorni dopo almeno un'immunizzazione di richiamo dell'immunogeno e quindi vengono fatte crescere rapidamente in una coltura prima della fusione con le cellule di una linea cellulare di mieloma adatta. Le cellule possono venire fuse in presenza di un promotore di fusione, come, per esempio, un virus vaccino oppure polietilenglicole. Le cellule ibride ottenute nella fusione vengono clonate, e vengono selezionati i cloni cellulari che secernono gli anticorpi desiderati. Per esempio, le cellule della milza di topi Balb/c immunizzati con un immunogeno adatto possono venire fuse con le cellule della linea cellulare del mieloma PAI oppure con la linea cellulare del mieloma Sp2/0-Ag 14. Dopo la fusione, le cellule si espandono in un mezzo di coltura adatto, che viene additivato con un mezzo di selezione, per esempio il mezzo HAT, ad intervalli regolari per prevenire che le cellule normali del mieloma facciano crescere in modo eccessivo le cellule dell'ibridoma desiderato. Le cellule ibride ottenute vengono quindi selezionate per la secrezione degli anticorpi desiderati, per esempio un anticorpo che si lega a C5 ed inibisce la scissione di C5 in frammenti C5a e C5b.

In alcune forme di realizzazione, qualsiasi de-

gli anticorpi o loro frammenti leganti l'antigene descritti in questa sede possono venire prodotti in una cellula CHO. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi o i loro frammenti leganti l'antigene non contengono residui di acido sialico rilevabili.

In alcune forme di realizzazione, un esperto del settore può identificare un anticorpo anti-C5 da una libreria mirata non immunizzata come descritto, per esempio, nel brevetto U.S. n. 6.300.064 (rilasciato a Knappik et al.; Morphosys AG) e in Schoonbroodt et al. (2005) *Nucleic Acids Res* 33(9):e81.

Una sotto-popolazione di anticorpi selezionati usando i suddetti metodi può essere caratterizzata per la loro specificità e affinità di legame per un particolare immunogeno (per esempio C5) usando qualsiasi metodo immunologico o biochimico noto nella tecnica. Per esempio, il legame specifico di un anticorpo per C5 nativo a lunghezza completa può venire determinato per esempio usando metodi immunologici o biochimici come, ma non limitati a questi, un saggio ELISA, saggi SPR, un saggio di immunoprecipitazione, cromatografia per affinità e dialisi all'equilibrio, come descritto in precedenza. Gli immunosaggi che possono venire usati per analizzare il legame immunospecifico e la reattività trasversale degli anticorpi

comprendono, ma non sono limitati a questi, sistemi di saggi competitivi e non competitivi usando tecniche come Western blot, RIA, ELISA (saggio immunoassorbente legato all'enzima), immunosaggi a "sandwich", saggi di immunoprecipitazione, saggi di immunodiffusione, saggi di agglutinazione, saggi di fissazione del complemento, saggi immunoradiometrici, immunosaggi fluorescenti e immunosaggi della proteina A. Tali saggi e programmi sono ben noti nella tecnica.

Gli anticorpi possono anche venire saggiati usando saggi a base di SPR noti nella tecnica per la caratterizzazione dei parametri cinetici dell'interazione dell'anticorpo con C5. Qualsiasi strumento per SPR disponibile in commercio comprendente, ma non limitato a questi, BIAcore Instruments (Biacore AB; Uppsala, Sweden); lAsys instruments (Affinity Sensors; Franklin, Massachusetts); IBIS system (Windsor Scientific Limited; Berks, UK), SPR-CELLIA systems (Nippon Laser and Electronics Lab; Hokkaido, Japan) e SPR Detector Spreeta (Texas Instruments; Dallas, Texas) può venire usato nei metodi descritti in questa sede. Si vedano, per esempio, Mullett et al. (2000) *Methods* 22: 77-91; Dong et al. (2002) *Reviews in Mol Biotech* 82: 303-323; Fivash et al. (1998) *Curr Opin*

Biotechnol 9: 97-101; e Rich et al. (2000) Curr Opin Biotechnol 11: 54-61.

Si deve comprendere che i suddetti metodi possono venire anche usati per determinare se, per esempio, un anticorpo anti-C5 non si lega a proteine di C3 e/oppure C4 native a lunghezza completa.

Come descritto nei suddetti riferimenti, dopo la selezione dei fagi, le regioni che codificano per gli anticorpi dai fagi possono venire isolate ed usate per generare anticorpi interi, comprendenti anticorpi umani, oppure qualsiasi frammento desiderato, ed espressi in qualsiasi ospite desiderato, comprendenti cellule di mammiferi, cellule di insetti, cellule vegetali, lieviti e batteri, per esempio come descritto in dettaglio in quanto segue. Per esempio, possono venire anche utilizzate tecniche per la produzione ricombinante di frammenti Fab, Fab' e F(ab')₂, usando metodi noti nella tecnica, come quelli descritti nella pubblicazione PCT n. WO 92/22324; Mullinax et al. (1992) BioTechniques 12(6):864-869; and Sawai et al. (1995) Am J Repr Immunol 34:26-34; e Better et al. (1988) Science 240:1041-1043. Esempi di tecniche che possono venire usate per produrre Fv e anticorpi a catena singola comprendono quelle descritte nei brevetti U.S. numeri 4.946.778 e 5.258.498; Huston et

al. (1991) *Methods in Enzymology* 203:46-88; Shu et al. (1993) *Proc Nat Acad Sci USA* 90:7995-7999; e Skerra et al. (1988) *Science* 240:1038-1040.

In alcune forme di realizzazione, la mappatura degli epitopi può venire usata per identificare, per esempio, la regione di C5 che interagisce con un anticorpo. Metodi per l'identificazione dell'epitopo al quale si lega un anticorpo particolare sono anche noti nella tecnica, e sono stati descritti in precedenza.

Gli anticorpi ed i loro frammenti identificati in questa sede possono essere "chimerici" oppure possono diventare "chimerici". Gli anticorpi chimerici ed i loro frammenti leganti l'antigene comprendono porzioni di due o più di specie differenti (per esempio topo e uomo). Gli anticorpi chimerici possono venire prodotti con regioni variabili di topo aventi la specificità desiderata fuse con domini costanti umani (per esempio il brevetto U.S. n. 4.816.567). In questo modo, gli anticorpi non umani possono venire modificati, rendendoli più adatti ad applicazioni cliniche nell'uomo (per esempio metodi per il trattamento o la prevenzione di un disturbo mediato dal complemento in un soggetto).

Gli anticorpi monoclonali della presente descri-

zione comprendono forme "umanizzate" di anticorpi non umani (per esempio topo). I mAb umanizzati oppure innestati nelle CDR sono particolarmente utili come agenti terapeutici per l'uomo poiché non vengono eliminati dalla circolazione così rapidamente come gli anticorpi di topo e non provocano tipicamente una reazione immunologica negativa. In generale, un anticorpo umanizzato ha uno o più residui di amminoacidi introdotti nello stesso da una fonte non umana. Questi residui di amminoacidi non umani vengono spesso indicati come residui "di importazione", che vengono tipicamente prelevati da un dominio variabile "di importazione". Metodi per la preparazione di anticorpi umanizzati sono generalmente ben noti nella tecnica. Per esempio, l'umanizzazione può venire eseguita essenzialmente dopo il metodo di Winter e colleghi (si vedano per esempio Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327; e Verhoeyen et al. (1988) *Science* 239: 1534-1536), mediante sostituzione delle regioni strutturali o delle sequenze delle CDR di roditori con le sequenze corrispondenti di un anticorpo umano. Si vedano anche, per esempio, Staelens et al. (2006) *Mol Immunol* 43:1243-1257. In alcune forme di realizzazione, le forme umanizzate di anticorpi non umani (per esem-

pio di topo) sono anticorpi umani (anticorpi del ricevente) in cui i residui di amminoacidi della regione CDR dell'anticorpo non umano (per esempio anticorpo di topo, ratto, coniglio oppure di un primate non umano) aventi la specificità, affinità e capacità di legame desiderate, vengono innestati sul supporto strutturale di un anticorpo umano.

In alcuni casi, uno o più residui di amminoacidi delle regioni strutturali dell'immunoglobulina umana sono anche sostituiti da residui di amminoacidi corrispondenti dell'anticorpo non umano (le cosiddette "mutazioni inverse"). Inoltre, possono venire usate librerie di visualizzazione dei fagi per variare gli amminoacidi alle posizioni scelte all'interno della sequenza di anticorpi. Le proprietà di un anticorpo umanizzato vengono anche influenzate dalla scelta della regione strutturale umana. Inoltre, gli anticorpi umanizzati e chimerizzati possono venire modificati per comprendere residui che non si trovano nell'anticorpo del ricevente oppure nell'anticorpo del donatore, per migliorare ulteriormente le proprietà degli anticorpi, come, per esempio, la funzione di affinità o effettrice.

Nella descrizione vengono anche forniti anticorpi interamente umani. L'espressione "anticorpo umano"

comprende anticorpi aventi regioni variabili e costanti (se presenti) derivate da sequenze di immunoglobuline umane, preferibilmente sequenze della linea germinale umana. Gli anticorpi umani possono comprendere residui di amminoacidi non codificati da sequenze di immunoglobuline della linea germinale umana (per esempio mutazioni introdotte mediante mutagenesi sito-specifica o casuale in vitro oppure mediante mutazione somatica in vivo). Tuttavia, l'espressione "anticorpo umano" non comprende anticorpi in cui le sequenze delle CDR derivate da un'altra specie di mammifero, come un topo, sono state innestate sulle sequenze delle regioni strutturali umane (vale a dire anticorpi umanizzati). Gli anticorpi interamente umani oppure umani possono venire derivati da topi transgenici che contengono geni di anticorpi umani (contenenti esoni variabili (V), di diversità (D), in giunzione (J) e costanti (C)) oppure da cellule umane.

Le sequenze umane possono codificare sia per le catene pesanti sia per le catene leggere di anticorpi umani ed agiscono in modo corretto nei topi, subendo ridisposizioni per fornire un repertorio di anticorpi ampio simile a quello dell'uomo. I topi transgenici possono venire immunizzati con l'immunogeno della

proteina bersaglio per creare una serie diversa di anticorpi specifici e dei loro RNA codificanti. Gli acidi nucleici che codificano per i componenti delle catene di tali anticorpi possono venire quindi clonati dall'animale in un vettore di visualizzazione. Tipicamente, le popolazioni separate di acidi nucleici che codificano per le sequenze delle catene pesanti e leggere vengono clonate, e le popolazioni separate vengono quindi ricombinate sull'inserimento nel vettore, tale che qualsiasi data copia del vettore riceva una combinazione casuale di una catena pesante e leggera. Il vettore viene indicato per esprimere catene di anticorpi tale che essi possano venire assemblati e visualizzati sulla superficie esterna di un elemento di visualizzazione contenente il vettore. Per esempio, le catene di anticorpi possono venire espresse come proteine di fusione con una proteina con rivestimento di fagi dalla superficie esterna del fago. Dopodiché, gli elementi di visualizzazione possono venire selezionati e valutati per visualizzazione di anticorpi che si legano ad un bersaglio.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi anti-C5 descritti in questa sede comprendono una regione costante della catena pesante modificata che presenta una funzione effettrice ridotta (o non pre-

senta alcuna funzione) rispetto alla sua regione costante non modificata corrispondente. Le funzioni effettrici che coinvolgono la regione costante dell'anticorpo anti-C5 possono venire modulate mediante modifica delle proprietà della regione costante o di Fc. Le funzioni effettrici modificate comprendono, per esempio, una modulazione in una o più delle seguenti attività: citotossicità cellulare dipendente dagli anticorpi (ADCC), citotossicità dipendente dal complemento (CDC), apoptori, legame con uno o più recettori di Fc e risposte pro-infiammatorie. La modulazione si riferisce ad un aumento, diminuzione oppure eliminazione di un'attività di funzione effettrice presentata da un anticorpo in oggetto contenente una regione costante modificata in confronto all'attività della forma non modificata della regione costante. In forme di realizzazione particolari, la modulazione comprende situazioni in cui un'attività viene abolita oppure è completamente assente.

Una regione costante modificata con affinità di legame con FcR modificata e/oppure con attività di ADCC e/oppure con attività di CDC modificata è un polipeptide che presenta un'attività di legame con FcR e/oppure un'attività di ADCC e/oppure un'attività di CDC migliorate oppure diminuite in confronto alla

forma non modificata della regione costante. Una regione costante modificata che mostra un legame aumentato con un FcR si lega almeno ad un FcR con maggiore affinità rispetto ad un polipeptide non modificato. Una regione costante modificata che mostra un legame diminuito con un FcR si lega almeno ad un FcR con minore affinità rispetto alla forma non modificata della regione costante. Tali varianti che mostrano un legame diminuito con un FcR possono possedere un legame ridotto oppure nessun legame apprezzabile con un FcR, per esempio dallo 0 al 50% (per esempio meno del 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, oppure 1%) del legame con l'FcR in confronto al livello di legame di una regione costante o di Fc dell'immunoglobulina delle sequenze native con l'FcR. Analogamente, una regione costante modificata che mostra attività di ADCC e/oppure di CDC modulate può presentare attività di ADCC e/oppure di CDC aumentate o ridotte in confronto alla regione costante non modificata. Per esempio, in alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-C5 comprendente una regione costante modificata può presentare approssimativamente dallo 0 al 50% (per esem-

pio meno del 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, oppure 1%) dell'attività di ADCC e/oppure di CDC della forma non modificata della regione costante. Un anticorpo anti-C5 descritto in questa sede comprendente una regione costante modificata che mostra ADCC e/oppure CDC ridotte può presentare attività di ADCC e/oppure di CDC ridotte oppure nessuna attività di ADCC e/oppure di CDC.

In certe forme di realizzazione, la regione costante modificata ha almeno una sostituzione, inserzione e/oppure delezione di amminoacidi, in confronto ad una regione costante di sequenze native oppure alla regione costante non modificata, per esempio da circa una a circa cento sostituzioni, inserzioni e/oppure delezioni di amminoacidi, in una regione costante di sequenze native oppure nella regione costante del polipeptide originario. In alcune forme di realizzazione, la regione costante modificata in questa sede avrà almeno circa il 70% di omologia (somiglianza) oppure identità con la regione costante non modificata ed in alcuni casi almeno circa il 75% ed in altri casi almeno circa l'80% di omologia o iden-

tità con la stessa, ed in altre forme di realizzazione almeno circa l'85%, il 90% oppure il 95% di omologia o identità con la stessa. La regione costante modificata può contenere inoltre una o più delezioni o inserzioni di amminoacidi. Inoltre, la regione costante modificata può contenere una o più sostituzioni, delezioni oppure inserzioni di amminoacidi che hanno come risultato modifiche post-traslazionali modificate, comprendenti, per esempio, un modello di glicosilazione modificato (per esempio l'aggiunta di uno o più componenti di zucchero, la perdita di uno o più componenti di zucchero oppure un cambiamento nella composizione di uno o più componenti di zucchero rispetto alla regione costante non modificata).

Gli anticorpi con funzioni di effettori modificate oppure senza funzioni di effettori possono venire generati modificando oppure producendo anticorpi con varianti delle regioni costanti, di Fc oppure della catena pesante; per produrre anticorpi con funzione e/oppure attività modificate, possono venire usate la tecnologia di DNA ricombinante e/oppure condizioni di coltura e di espressione cellulari. Per esempio, la tecnologia di DNA ricombinante può venire usata per modificare una o più sostituzioni, delezioni oppure inserzioni di amminoacidi in regioni (come,

per esempio regioni di Fc o costanti) che influiscono sulla funzione dell'anticorpo comprendenti le funzioni effettrici. In alternativa, si possono ottenere cambiamenti nelle modifiche post-traslazionali come, per esempio, modelli di glicosilazione, modificando le condizioni di coltura e di espressione cellulare mediante le quali viene prodotto l'anticorpo. Metodi adatti per l'introduzione di una o più sostituzioni, aggiunte o delezioni in una regione di Fc di un anticorpo sono ben noti nella tecnica e comprendono, per esempio, tecniche di mutagenesi di DNA standard, come descritto per esempio in Sambrook et al. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Harlow and Lane (1988), come sopra; Borrebaek (1992), come sopra; Johne et al. (1993), come sopra; pubblicazione PCT publication n. WO 06/53301; e brevetto U.S. n. 7.704.497.

In alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-C5 descritto in questa sede presenta una funzione effettrice ridotta oppure non presenta alcuna funzione effettrice. In alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-C5 comprende una regione costante ibrida, oppure una sua porzione, come una regione costante ibrida di G2/G4 (si vedano per esempio Burton

et al. (1992) Adv Immun 51: 1-18; Canfield et al. (1991) J Exp Med 173: 1483-1491; e Mueller et al. (1997) Mol Immunol 34(6):441-452). Si veda quanto precede.

Oltre all'utilizzo di un costrutto di G2/G4 descritto in precedenza, un anticorpo anti-C5 descritto in questa sede avente funzione effettrice ridotta può venire prodotto mediante introduzione di altri tipi di cambiamenti nella sequenza di amminoacidi di certe regioni dell'anticorpo. Tali cambiamenti nelle sequenze di amminoacidi comprendono, ma non sono limitati a questa, la mutazione Ala-Ala descritta per esempio nelle pubblicazioni PTC numeri WO 94/28027 e WO 98/47531; e Xu et al. (2000) Cell Immunol 200:16-26. Quindi, in alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-C5 con una o più mutazioni all'interno della regione costante comprendente la mutazione Ala-Ala ha una funzione effettrice ridotta oppure non ha alcuna funzione. Secondo queste forme di realizzazione, la regione costante dell'anticorpo può comprendere una sostituzione di una alanina alla posizione 234 oppure una mutazione in una alanina alla posizione 235. Inoltre, la regione costante modificata può contenere una doppia mutazione; una mutazione in una alanina alla posizione 234 ed una seconda mutazione

in una alanina alla posizione 235. In una forma di realizzazione, un anticorpo anti-C5 comprende una regione strutturale di IgG4, in cui la mutazione Ala-Ala descrive una mutazione (mutazioni) da fenilalanina ad alanina alla posizione 234 e/oppure una mutazione da leucina ad alanina alla posizione 235. In un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo anti-C5 comprende una regione strutturale di IgG1, in cui la mutazione Ala-Ala descrive una mutazione (mutazioni) da leucina a alanina alla posizione 234 e/oppure una mutazione da leucina a alanina alla posizione 235. Un anticorpo anti-C5 può contenere inoltre, oppure in alternativa, altre mutazioni, comprendenti la mutazione puntiforme K322A nel dominio di CH2 (Hezareh et al. (2001) *J Virol* 75:12161-12168). Un anticorpo con detta mutazione (mutazioni) nella regione costante può essere inoltre un anticorpo bloccante oppure non bloccante.

Altre sostituzioni che, quando introdotte in una regione costante della catena pesante, hanno come risultato una funzione effettrice diminuita, vengono esposte, per esempio, in Shields et al. (2001) *J Biol Chem* 276(9):6591-6604. Si veda in particolare la tabella 1 ("Legame di varianti di IgG1 umane in FcRn e FcγR umani) di Shields et al. Selezionando una libere-

ria di anticorpi anti-IgE, ciascun anticorpo della libreria che si differenzia mediante una o più sostituzioni nella regione costante della catena pesante per legame con un gruppo di recettori di Fc (comprendenti FcRn, FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB e FcγRIIIA), gli autori hanno identificato numerose sostituzioni che modulano le interazioni dei recettori specifici Fc-Fc. Per esempio, una variante della regione costante della catena pesante di IgG2a in cui il dominio CH2 contiene una sostituzione D265A (numerazione degli amminoacidi della catena pesante secondo Kabat et al. (come sopra)) ha come risultato una perdita completa di interazione tra la variante della regione costante ed i recettori di Fc di IgG FcγRIIB, FcγRIII, FcγRI e FcγRIV. Shields et al. (2001) alla pagina 6595, tabella 1. Si vedano inoltre Baudino et al. (2008) *J Immunol* 181:6664-6669 (come sopra).

I cambiamenti all'interno della regione cerniera influiscono anche sulle funzioni effettrici. Per esempio, la delezione della regione cerniera può ridurre l'affinità per i recettori di Fc e può ridurre l'attivazione del complemento (Klein et al. (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* 78:524-528). La presente descrizione si riferisce quindi inoltre ad anticorpi con alterazioni nella regione cerniera.

In alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-C5 può contenere una regione costante alterata che presenta un miglioramento oppure una riduzione della citotossicità dipendente dal complemento (CDC). L'attività modulata della CDC può venire ottenuta mediante introduzione di una o più sostituzioni, inserzioni oppure delezioni in una regione di Fc dell'anticorpo. Si veda per esempio il brevetto U.S. n. 6.194.551. Inoltre oppure in alternativa, il residuo (residui) di cisteina può venire introdotto nella regione di Fc, consentendo in tal modo la formazione del legame disolfuro intercatena in questa regione. L'anticorpo omodimerico così generato può avere una capacità di internalizzazione migliorata o ridotta e/oppure una uccisione delle cellule mediata dal complemento aumentata oppure diminuita. Si vedano per esempio Caron et al. (1992) *J Exp Med* 176:1191-1195 e Shopes (1992) *Immunol* 148:2918-2922; pubblicazioni PCT numeri WO 99/51642 e WO 94/29351; Duncan and Winter (1988) *Nature* 322:738-40; e brevetti U.S. numeri 5.648.260 e 5.624.821. Altri mezzi potenziali di modulazione della funzione effettrice degli anticorpi comprendono cambiamenti nella glicosilazione, che vengono riassunti per esempio in Raju (2003) *BioProcess International* 1(4):44-53. Secondo Wright e Mor-

risson, la microeterogeneità degli oligosaccaridi di IgG umane può influire sulle funzioni biologiche come CDC e ADCC, legami con vari recettori di Fc e legami con la proteina C1q (1997) *TIBTECH* 15:26-32. I modelli di glicosilazione degli anticorpi possono differire a seconda delle condizioni di produzione delle cellule e di coltura delle cellule (Raju, come sopra). Tali differenze possono portare a cambiamenti sia nella funzione effettrice sia nelle farmacocinetiche. Si vedano, per esempio, Israel et al. (1996) *Immunology* 89(4):573-578; e Newkirk et al. (1996) *Clin Exp Immunol* 106(2):259-264. Le differenze nella funzione effettrice possono essere correlate alla capacità della IgG di legarsi ai recettori di Fc γ (Fc γ R) sulle cellule effettrici. Shields et al. hanno mostrato che le IgG, con alterazioni nella sequenza di amminoacidi che presentano un legame migliorato con Fc γ R, possono presentare un miglioramento della ADCC fino al 100% usando le cellule effettrici umane. (2001) *J Biol Chem* 276(9):6591-6604. Sebbene queste alterazioni comprendano cambiamenti negli amminoacidi non trovati all'interfaccia del legame, sia la natura del componente di zucchero sia il suo modello strutturale possono anche contribuire alle differenze osservate. Inoltre, la presenza o l'assenza di fucosio

nel componente oligosaccaride di una IgG può migliorare il legame e l'ADCC. Si vedano per esempio Shields et al. (2002) J Biol Chem 277(30):26733-26740. Una IgG che non presenta un carboidrato fuco-silato legato a Asn297 presentava un legame normale del recettore con il recettore di FcγRI. Al contrario, il legame con il recettore di FcγRIIIA è stato migliorato di 50 volte ed accompagnato da un miglioramento della ADCC, specialmente a concentrazioni inferiori di anticorpi.

Vi sono ancora altri approcci per alterare la funzione effettrice degli anticorpi. Per esempio, le cellule che producono anticorpi possono essere iper-mutagene, generando in tal modo anticorpi con residui di polipeptidi casualmente alterati attraverso l'intera molecola dell'anticorpo. Si veda per esempio la pubblicazione PCT n. WO 05/011735. Le cellule ospite ipermutagene comprendono cellule prive della riparazione degli accoppiamenti errati di DNA. Gli anticorpi prodotti in questo modo possono essere meno antigenici e/oppure possono avere proprietà farmacocinetiche vantaggiose. Inoltre, tali anticorpi possono venire scelti per proprietà quali il miglioramento o la diminuzione della funzione (funzioni) effettrice. Altri dettagli sulle tecniche di biologia molecolare

utili per la preparazione di un anticorpo o di un suo frammento legante l'antigene descritte in questa sede vengono esposte in quanto segue.

Espressione e purificazione di anticorpi ricombinanti

Gli anticorpi o i loro frammenti leganti l'antigene descritti in questa sede possono venire prodotti usando una varietà di tecniche note nella biologia molecolare e nella chimica delle proteine. Per esempio, un acido nucleico che codifica per uno oppure per entrambi i polipeptidi a catena pesante e a catena leggera di un anticorpo può venire inserito in un vettore di espressione che contiene sequenze regolatorie trascrizionali e traslazionali, che comprendono, per esempio, sequenze promotrici, siti di legame ribosomiale, sequenze di inizio della trascrizione e di arresto della trascrizione, sequenze di inizio della traslazione e di arresto della traslazione, segnali terminatori della trascrizione, segnali di poliadenilazione e sequenze miglioratrici o attivatrici. Le sequenze regolatorie comprendono un promotore e sequenze di inizio della trascrizione e di arresto della trascrizione. Inoltre, il vettore di espressione può comprendere più di un sistema di replicazione tale da poter venir mantenuto in due organismi differenti, per esempio in cellule di mammifero o di in-

setto per l'espressione e in un ospite procariote per la clonazione e l'amplificazione.

Varie modifiche, per esempio sostituzioni, possono venire introdotte nelle sequenze di DNA che codificano per i polipeptidi a catena pesante e/oppure leggera descritti in questa sede usando metodi standard noti agli esperti del settore. Per esempio, l'introduzione di una sostituzione di istidina in una o più posizioni delle CDR di un anticorpo può venire effettuata usando metodi standard, come mutagenesi mediata dalla PCR, in cui i nucleotidi mutati vengono incorporati negli inneschi per PCR in modo tale che il prodotto della PCR contenga le mutazioni oppure la mutagenesi sito-diretta descritte. Una sostituzione può venire introdotta in una o più delle regioni delle CDR per aumentare oppure diminuire la K_D dell'anticorpo per l'antigene, per esempio a pH 7,4 oppure pH 6,0. Tecniche per mutagenesi sito-diretta sono ben note nella tecnica. Si vedano per esempio Sambrook et al., come sopra.

Diversi sistemi vettore possibili sono disponibili per l'espressione di polipeptidi a catena pesante e a catena leggera clonati da acidi nucleici in cellule di mammiferi. Una categoria di vettori si basa sull'integrazione delle sequenze geniche desidera-

te nel genoma cellulare dell'ospite. Le cellule che hanno integrato in modo stabile il DNA possono venire scelte mediante introduzione simultanea di geni con resistenza ai farmaci come E. coli gpt (Mulligan and Berg (1981) Proc Natl Acad Sci USA 78:2072) oppure Tn5 neo (Southern and Berg (1982) Mol Appl Genet 1:327). Il gene marcatore selezionabile può essere legato alle sequenze geniche di DNA da esprimere oppure può venire introdotto nella stessa cellula mediante co-trasfezione (Wigler et al. (1979) Cell 16:77). Una seconda categoria di vettori utilizza elementi di DNA che conferiscono capacità di replicazione in modo autonomo ad un plasmide extracromosomiale. Questi vettori possono derivare da virus di animali, come papillomavirus bovino (Sarver et al. (1982) Proc Natl Acad Sci USA, 79:7147), cytomegalovirus, polyoma virus (Deans et al. (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81:1292), oppure virus SV40 (Lusky and Botchan (1981) Nature 293:79).

I vettori di espressione possono venire introdotti in cellule in un modo adatto per successive espressione dell'acido nucleico. Il metodo di introduzione viene fortemente dettato dal tipo di cellule bersaglio, descritte in quanto segue. Metodi esemplificativi comprendono precipitazione di CaPO₄, fusione

di liposomi, liposomi cationici, elettroporazione, infezione virale, trasfezione mediata da destrano, trasfezione mediata da Polybrene, fusione di protoplasti e microiniezione diretta.

Cellule ospite appropriate per l'espressione di anticorpi oppure di loro frammenti leganti l'antigene comprendono lieviti, batteri, cellule di insetti, cellule vegetali e cellule di mammiferi. Di particolare interesse sono batteri come *E. coli*, funghi come *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*, cellule di insetti come SF9, linee cellulari di mammiferi (per esempio linee cellulari umane), come pure linee cellulari di primati.

In alcune forme di realizzazione, un anticorpo oppure un suo frammento possono venire espressi in, e purificati da animali transgenici (per esempio mammiferi transgenici). Per esempio, un anticorpo può venire prodotto in mammiferi transgenici non umani (per esempio, roditori) ed isolato dal latte come descritto, per esempio, in Houdebine (2002) *Curr Opin Biotechnol* 13(6):625-629; van Kuik-Romeijn et al. (2000) *Transgenic Res* 9(2):155-159; e Pollock et al. (1999) *J Immunol Methods* 231(1-2):147-157.

Gli anticorpi ed i loro frammenti possono venire prodotti dalle cellule mediante coltura di una cellu-

la ospite trasformata con il vettore di espressione contenente acido nucleico che codifica per gli anticorpi o i frammenti in condizioni, e per una quantità di tempo, sufficienti a consentire l'espressione delle proteine. Tali condizioni per l'espressione di proteine varieranno con la scelta del vettore di espressione e della cellula ospite, e verranno facilmente verificate da un esperto del settore attraverso esperimenti usuali. Per esempio, gli anticorpi espressi in *E. coli* possono venire nuovamente ripiegati da corpi di inclusione (si vedano per esempio Hou et al. (1998) *Cytokine* 10:319-30). I sistemi di espressione batterica ed i metodi per il loro uso sono ben noti nella tecnica (si veda *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley & Sons, and *Molecular Cloning—A Laboratory Manual—3rd Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)). La scelta di codoni, vettori di espressione adatti e cellule ospiti adatte varierà a seconda del numero di fattori, e può venire facilmente ottimizzata quando necessario. Un anticorpo (oppure un suo frammento) descritto in questa sede può venire espresso in cellule di mammifero oppure in altri sistemi di espressione comprendenti, ma non limitati a questi, lieviti, baculovirus e sistemi di espressione in vitro (si vedano per

esempio Kaszubska et al. (2000) Protein Expression and Purification 18:213-220).

Dopo l'espressione, gli anticorpi ed i loro frammenti possono venire isolati. Il termine "purificato" oppure "isolato" quando applicato a qualsiasi delle proteine (anticorpi o frammenti) descritte in questa sede si riferisce ad un polipeptide che è stato separato oppure purificato da componenti (per esempio proteine oppure altre molecole biologiche o organiche presenti in natura) che lo accompagnano in natura, per esempio altre proteine, lipidi e acido nucleico in un procariote che esprime le proteine. Tipicamente, un polipeptide viene purificato quando costituisce almeno il 60% in peso (per esempio almeno il 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 97, oppure 99) della proteina totale in un campione.

Un anticorpo oppure un suo frammento possono venire isolati oppure purificati in una varietà di modi noti agli esperti del settore a seconda di quali altri componenti siano presenti nel campione. Metodi di purificazione standard comprendono tecniche elettroforetiche, molecolari, immunologiche e cromatografiche comprendenti cromatografia a scambio ionico, idrofobica, per affinità e HPLA a fase inversa. Per esempio, un anticorpo può venire purificato usando

una colonna standard anti-anticorpo (per esempio una colonna di proteina A oppure proteina B). Sono anche utili tecniche di ultrafiltrazione e diafiltrazione, unitamente a concentrazione di proteine. Si vedano per esempio Scopes (1994) "Protein Purification, 3rd edition", Springer-Verlag, New York City, New York. Il grado di purificazione necessario varierà a seconda dell'uso desiderato. In alcuni casi, non sarà necessaria alcuna purificazione dell'anticorpo o dei suoi frammenti espressi.

Metodi per determinare la resa o la purezza di un anticorpo o un suo frammento purificato sono noti nella tecnica, e comprendono, per esempio, saggio Bradford, spettroscopia UV, saggio delle proteine con metodo del biuretto, saggio delle proteine di Lowry, saggio delle proteine con Amido Black, cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC), spettrometria di massa (MS) e metodi elettroforetici su gel (per esempio usando una macchia di proteine come blu di Coomassie oppure una macchia di argento colloidale).

In alcune forme di realizzazione, l'endotossina può venire rimossa dagli anticorpi o frammenti. Metodi per la rimozione dell'endotossina da un campione di proteine sono noti nella tecnica. Per esempio, l'endotossina può venire rimossa da un campione di

proteine usando una varietà di reagenti disponibili in commercio comprendenti, senza limiti, ProteoSpin™, kit per la rimozione di endotossine (Norgen Biotek Corporation), Detoxi-Gel, gel per la rimozione di endotossine (Thermo Scientific; Pierce Protein Research Products), MiraCLEAN®, kit per la rimozione delle endotossine (Mirus) oppure Acrodisc™ - Mustang® E membrane (Pall Corporation).

Metodi per rilevare e/oppure misurare la quantità di endotossina presente in un campione (sia prima sia dopo la purificazione) sono noti nella tecnica e sono disponibili kit commerciali. Per esempio, la concentrazione di endotossina in un campione di proteina può venire determinata usando il kit QCL-1000 Chromogenic (BioWhittaker) oppure kit a base di lisato di amebociti di Limulus (LAL), come kit di Pyrotell®, Pyrotell®-T, Pyrochrome®, Chromo-LAL, e CSE disponibili presso la Associates of Cape Cod Incorporated.

Modifiche degli anticorpi o dei loro frammenti leganti l'antigene

Gli anticorpi o i loro frammenti leganti l'antigene possono venire modificati dopo la loro espressione e purificazione. Le modifiche possono essere modifiche covalenti oppure non covalenti. Tali modi-

fiche possono venire introdotte negli anticorpi o frammenti mediante, per esempio, reazione di residui di amminoacidi bersaglio del polipeptide con un agente di derivatizzazione organico che sia in grado di reagire con catene laterali scelte o residui terminali. Siti adatti per le modifiche possono venire scelti usando qualsiasi di una varietà di criteri, comprendenti, per esempio, analisi strutturale oppure analisi delle sequenze di amminoacidi degli anticorpi o dei frammenti.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi oppure i loro frammenti leganti l'antigene possono venire coniugati ad una metà eterologa. La metà eterologa può essere, per esempio, un polipeptide eterologo, un agente terapeutico (per esempio una tossina oppure un farmaco) oppure un marcatore rilevabile come, ma non limitato a questi, un marcatore radioattivo, un marcatore enzimatico, un marcatore fluorescente, un marcatore di metallo pesante, un marcatore luminescente oppure un marcatore di affinità come biotina oppure streptavidina. Polipeptidi eterologhi adatti comprendono, per esempio, un marcatore antigenico (per esempio FLAG (DYKDDDDK (SEQ ID n. 20)), polliistidina (6-His; HHHHHH (SEQ ID n. 21)), emagglutina (HA; YPYDVPDYA (SEQ ID n. 22)), glutatione-S-

transferasi (GST) oppure proteina legante il maltosio (MBP)) per l'uso nella purificazione degli anticorpi o dei frammenti. I polipeptidi eterologhi comprendono anche polipeptidi (per esempio enzimi) che sono utili come marcatori diagnostici oppure rilevabili, per esempio luciferasi, una proteina fluorescente (per esempio proteina fluorescente verde (GFP)), oppure cloramfenicolacetiltransferasi (CAT). Marcatori radioattivi adatti comprendono, per esempio, ^{32}P , ^{33}P , ^{14}C , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S e ^3H . Marcatori fluorescenti adatti comprendono, senza limiti, fluoresceina, fluoresceina isotiocianato (FITC), proteina fluorescente verde (GFP), DyLight™488, ficoeritrina (PE), ioduro di propidio (PI), PerCP, PE-Alexa Fluor®700, Cy5, allofocianina e Cy7. Marcatori luminescenti comprendono, per esempio, qualsiasi di una varietà di chelati di lantanidi luminescenti (per esempio europio oppure terbio). Per esempio, chelati di europio adatti comprendono il chelato di europio di acido dietilenti-triammina-pentaacetico (DTP A) oppure acido tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacetico (DOTA). I marcatori enzimatici comprendono, per esempio, fosfatasi alcalina, CAT, luciferasi e perossidasi di barbafor-te.

Due proteine (per esempio un anticorpo ed una

metà eterologa) possono venire reticolate usando qualsiasi di numerosi reticolanti chimici noti. Esempi di tali reticolanti sono quelli che collegano due residui di amminoacidi attraverso un legame che comprende un legame disolfuro "bloccato". In questi legami, un legame disolfuro all'interno dell'unità reticolante viene protetto (bloccando gruppi su uno dei lati del legame disolfuro) dalla riduzione mediante l'azione, per esempio, di glutatione ridotto oppure dell'enzima disolfuro reduttasi. Un reagente adatto, 4-succinimmidilossicarbonil- α -metil- α (2-piridildi-tio)toluene (SMPT), forma tale legame tra due proteine utilizzando una lisina terminale su una delle proteine ed una cisteina terminale sull'altra.

Possono venire anche usati reagenti eterobifunzionali che reticolano mediante una parte di accoppiamento differente su ciascuna proteina. Altri reticolanti utili comprendono, senza limiti, reagenti che collegano due gruppi di amminoacidi (per esempio N-5-azido-2-nitrobenzoilossisuccinimide), due gruppi solfidrile (per esempio 1,4-bis-maleimmidobutano), un gruppo ammino e un gruppo solfifrile (per esempio estere di m-maleimmidobenzoil-N-idrossisuccinimide), un gruppo ammino ed un gruppo carbossile (per esempio 4-[p-azidosalicilammido]butilammina), ed un gruppo

ammino ed un gruppo di guanidina che è presente nella catena laterale dell'arginina (per esempio p-azidofenilgliossal-monoidrato).

In alcune forme di realizzazione, un marcatore radioattivo può venire direttamente coniugato con lo scheletro di aminoacidi dell'anticorpo. In alternativa, il marcatore radioattivo può venire compreso come parte di una molecola più grande, per esempio ^{125}I in meta- ^{125}I iodofenil-N-idrossisuccinimide (^{125}I mIPNHS) che si lega con i gruppi ammino liberi per formare derivati di meta-iodofenile (mIP) di proteine rilevanti (si vedano per esempio Rogers et al. (1997) *J Nucl Med* 38:1221-1229) oppure chelati (per esempio con DOTA oppure DTPA) che sono a loro volta legati allo scheletro delle proteine. Metodi per coniugare i marcatori radioattivi o molecole/chelati più grandi contenenti gli stessi con gli anticorpi o con i frammenti leganti l'antigene descritti in questa sede sono noti nella tecnica. Tali metodi comportano l'incubazione delle proteine con il marcatore radioattivo in condizioni (per esempio pH, concentrazione di sale e/oppure temperatura) che facilitano il legame del marcatore radioattivo o del chelato con la proteina (si veda per esempio il brevetto U.S. 6.001.329).

Metodi per coniugare un marcatore fluorescente (talvolta indicato come "fluoroforo") con una proteina (per esempio un anticorpo) sono noti nella tecnica della chimica delle proteine. Per esempio i fluorofori possono venire coniugati con gruppi ammino liberi (per esempio di lisine) oppure gruppi solfidrile (per esempio cisteine) di proteine usando parti di estere di succinimidile (NHS) oppure estere di tetrafluorofenile (TFP) legate ai fluorofori. In alcune forme di realizzazione, i fluorofori possono venire coniugati con una parte reticolante eterobifunzionale come solfo-SMCC. Metodi di coniugazione adatti comportano l'incubazione di una proteina di anticorpo, oppure un suo frammento, con il fluoroforo in condizioni che facilitano il legame del fluoroforo con la proteina. Si vedano per esempio Welch and Redvanly (2003) "Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications", John Wiley and Sons (ISBN 0471495603).

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi o i frammenti possono venire modificati, per esempio, con una parte che migliora la stabilizzazione e/oppure la conservazione degli anticorpi in circolazione per esempio nel sangue, nel siero o in altri tessuti. Per esempio, l'anticorpo o il frammento possono venire PEGilati come descritto, per esempio, in

Lee et al. (1999) *Bioconjug Chem* 10(6):973-8;
Kinstler et al. (2002) *Advanced Drug Deliveries Re-*
views 54:477-485; and Roberts et al. (2002) *Advanced*
Drug Delivery Reviews 54:459-476 oppure HESilati
(Fresenius Kabi, Germany; si vedano per esempio Pavi-
sic et al. (2010) *Int J Pharm* 387(1-2):110-119). La
parte di stabilizzazione può migliorare la stabilità
oppure la conservazione dell'anticorpo (o del fram-
mento) di almeno 1,5 volte (per esempio almeno 2, 5,
10, 15, 20, 25, 30, 40, o 50 o più volte).

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi
oppure i loro frammenti leganti l'antigene descritti
in questa sede possono venire glicosilati. In alcune
forme di realizzazione, un anticorpo oppure un suo
frammento legante descritti in questa sede possono
venire sottoposti a trattamento enzimatico oppure
chimico, oppure prodotti da una cellula, in modo tale
che l'anticorpo oppure il frammento abbiano una gli-
cosilazione ridotta oppure assente. Metodi per la
produzione di anticorpi con glicosilazione ridotta
sono noti nella tecnica e vengono descritti, per
esempio, nel brevetto U.S. n. 6.933.368; Wright et
al. (1991) *EMBO J* 10(10):2717-2723; and Co et al.
(1993) *Mol Immunol* 30:1361.

Composizioni e formulazioni farmaceutiche

Le composizioni descritte in questa sede possono venire formulate come una soluzione farmaceutica, per esempio per somministrazione ad un soggetto per il trattamento o la prevenzione di un disturbo associato al complemento. Le composizioni farmaceutiche comprenderanno generalmente un veicolo farmaceuticamente accettabile. L'espressione usata in questa sede "veicolo farmaceuticamente accettabile" si riferisce a, e comprende qualsiasi e tutti i solventi, mezzi di dispersione, rivestimenti, agenti antibatterici ed antifungini, agenti isotonici ed agenti che ritardano l'assorbimento e simili che sono fisiologicamente compatibili. Le composizioni possono comprendere un sale farmaceuticamente accettabile, per esempio un sale di addizione con acido oppure un sale di addizione con una base (si vedano per esempio Berge et al. (1977) J Pharm Sci 66:1-19).

Le composizioni possono venire formulate secondo metodi standard. La formulazione farmaceutica è una tecnica ben determinata, e viene ulteriormente descritta, per esempio, in Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20th Edition, Lippincott, Williams & Wilkins (ISBN: 0683306472); Ansel et al. (1999) "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems", 7th Edition, Lippincott Wil-

liams & Wilkins Publishers (ISBN: 0683305727); e Kibbe (2000) "Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association", 3rd Edition (ISBN: 091733096X). In alcune forme di realizzazione, una composizione può venire formulata, per esempio, come soluzione tamponata ad una concentrazione adatta e adatta per la conservazione a 2-8°C (per esempio 4°C). In alcune forme di realizzazione, una composizione può venire formulata per la conservazione ad una temperatura inferiore a 0°C (per esempio -20°C oppure -80°C). In alcune forme di realizzazione, la composizione può venire formulata per la conservazione fino a 2 anni (per esempio un mese, due mesi, tre mesi, quattro mesi, cinque mesi, sei mesi, sette mesi, otto mesi, nove mesi, 10 mesi, 11 mesi, 1 anno, 1 anno e ½ oppure 2 anni) a 2-8°C (per esempio 4°C). Quindi, in alcune forme di realizzazione, le composizioni descritte in questa sede sono stabili alla conservazione per almeno 1 anno a 2-8°C (per esempio 4°C).

Le composizioni farmaceutiche possono essere in una varietà di forme. Queste forme comprendono, per esempio, forme di dosaggio liquide, semi-solidi e solidi, come soluzioni liquide (per esempio soluzioni iniettabili e che non possono essere fuse), disper-

sioni o sospensioni, compresse, pillole, polveri, liposomi e supposte. La forma preferita dipende, in parte, dal modo di somministrazione previsto e dall'applicazione terapeutica prevista. Per esempio, le composizioni contenenti una composizione prevista per somministrazione sistemica o locale possono essere in forma di soluzioni iniettabili o che non possono essere fuse. Pertanto, le composizioni possono venire formulate per somministrazione mediante una modalità parentale (per esempio iniezione intravenosa, subcutanea, intraperitoneale oppure intramuscolare). Espressioni come "somministrazione parenterale", "somministrate per via parenterale" ed altre frasi grammaticalmente equivalenti usate in questa sede si riferiscono a modi di somministrazione diversi dalla somministrazione enterale e topica, solitamente mediante iniezione, e comprendono, senza limiti, iniezioni ed infusioni intravenose, intranasali, intraoculari, polmonari, intramuscolari, intraarteriali, intratecali, intracapsulari, intraorbitali, intracardiache, intradermali, intrapolmonari, intraperitoneali, transtracheali, subcutanee, subcuticolari, intraarticolari, subcapsulari, subaracnoidei, intraspinali, epidurali, intracerebrali, intracraniali, intracarotidee e intrasternali (si veda in quanto se-

gue).

Le composizioni possono venire formulate come soluzioni, microemulsioni, dispersioni, liposomi oppure altre strutture ordinate adatte per conservazione stabile ad alte concentrazioni. Le soluzioni iniettabili sterili possono venire preparate mediante incorporazione di una composizione descritta in questa sede nella quantità richiesta in un solvente appropriato con uno o una combinazione di ingredienti indicati in precedenza, quando richiesto, seguita da sterilizzazione per filtrazione. Generalmente, le dispersioni vengono preparate incorporando una composizione descritta in questa sede in un veicolo sterile che contiene un mezzo di dispersione basica e gli altri ingredienti richiesti tra quelli elencati in precedenza. Nel caso di polveri sterili per la preparazione di soluzioni iniettabili sterili, metodi per la preparazione comprendono essiccamento sotto vuoto e liofilizzazione che forniscono una polvere di una composizione descritta in questa sede più qualsiasi altro ingrediente (si veda in quanto segue) da una loro soluzione precedentemente filtrata sterile. La fluidità adeguata di una soluzione può venire mantenuta, per esempio, mediante l'uso di un rivestimento come lecitina, mediante mantenimento della dimensione

richiesta delle particelle nel caso di dispersione e mediante l'uso di tensioattivi. L'assorbimento prolungato di composizioni iniettabili può venire realizzato includendo nella composizione un reagente che ritarda l'assorbimento, per esempio sali di monostearato e gelatina.

Le composizioni descritte in questa sede possono venire anche formulate in composizioni di immunoliposomi. Tali formulazioni possono venire preparate mediante metodi noti nella tecnica, come, per esempio, i metodi descritti in Epstein et al. (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82:3688; Hwang et al. (1980) Proc Natl Acad Sci USA 77:4030; e brevetti U.S. numeri 4.485.045 e 4.544.545. I liposomi con tempo di circolazione migliorata sono descritti per esempio, nel brevetto U.S. n. 5.013.556.

In certe forme di realizzazione, le composizioni possono venire formulate con un veicolo che proteggerà il composto da un rilascio rapido, come una formulazione a rilascio controllato, comprendente impianti e sistemi di somministrazione microincapsulata. Possono venire usati polimeri biodegradabili, biocompatibili, come etilene-vinilacetato, polianidridi, acido poliglicolico, collagene, poliortoesteri e acido polilattico. Molti metodi per la preparazione di tali

formulazioni sono noti nella tecnica. Si vedano per esempio J. R. Robinson (1978) "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", Marcel Dekker, Inc., New York. In alcune forme di realizzazione, le composizioni possono venire formulate in una composizione adatta per somministrazione intrapolmonare (per esempio somministrazione mediante un inalatore o un nebulizzatore) ad un mammifero come l'uomo. Metodi per la formulazione di tali composizioni sono ben noti nella tecnica e descritti, per esempio, nella pubblicazione della domanda di brevetto n. 20080202513; brevetti U.S. numeri 7.112.341 e 6.019.968; e pubblicazioni PCT numeri WO 00/061178 e WO 06/122257. Formulazioni in polvere anidra per inalatori e sistemi adatti per somministrazione delle formulazioni sono descritti, per esempio, nella pubblicazione della domanda di brevetto U.S. n. 20070235029, pubblicazione PCT n. WO 00/69887; e brevetto U.S. n. 5.997.848. Altre formulazioni adatte per somministrazione intrapolmonare (come pure metodi per la formulazioni di polipeptidi) sono esposte, per esempio, nelle pubblicazioni delle domande di brevetto numeri 20050271660 e 20090110679.

In alcune forme di realizzazione, le composizioni possono venire formulate per somministrazione

nell'occhio. Il termine "occhio" usato in questa sede si riferisce a qualsiasi ed a tutte le strutture ed i tessuti anatomici associati all'occhio. L'occhio ha una parete costituita da tre strati distinti: la sclera esterna, la coroide che è lo strato medio, e la retina interna. La camera dietro al cristallino è riempita di un fluido gelatinoso, definito umor vitreo. Nella parte posteriore dell'occhio vi è la retina, che rileva la luce. La cornea è un tessuto otticamente trasparente, che trasporta le immagini verso la parte posteriore dell'occhio. La cornea comprende un percorso per la permeazione dei farmaci nell'occhio. Altre strutture tissutali anatomiche associate all'occhio comprendono il sistema di drenaggio lacrimale, che comprende un sistema secretivo, un sistema distributivo ed un sistema escretivo. Il sistema escretivo comprende dei secretori che vengono stimolati dal battito delle palpebre e dal cambiamento di temperatura dovuto all'evaporazione delle lacrime, e secretori di riflesso che hanno un impulso del nervo parasimpatico efferente e secernono lacrime in risposta ad una stimolazione fisica e emotiva. Il sistema distributivo comprende le palpebre ed il menisco lacrimale attorno ai bordi delle palpebre, che diffonde le lacrime sulla superficie oculare mediante

il battito, riducendo così lo sviluppo di zone secche.

In alcune forme di realizzazione, le composizioni possono venire somministrate localmente, per esempio per mezzo di applicazione topica oppure iniezione intravitreale. Per esempio, in alcune forme di realizzazione, le composizioni possono venire formulate per somministrazione mediante un collirio.

La preparazione terapeutica per il trattamento dell'occhio può contenere uno o più agenti attivi in una concentrazione da circa lo 0,01 a circa l'1% in peso, preferibilmente da circa lo 0,05 a circa lo 0,5% in una soluzione, sospensione oppure unguento farmaceuticamente accettabili. La preparazione sarà preferibilmente in forma di soluzione acquosa sterile contenente, per esempio, altri ingredienti come, ma non limitati a questi, conservanti, tamponi, agenti di tonicità, antiossidanti e stabilizzanti, agenti umettanti o chiarificanti non ionici ed agenti che aumentano la viscosità.

Conservanti adatti per l'uso in tale soluzione comprendono cloruro di benzalconio, cloruro di benzetonio, clorobutanolo, timerosal e simili. Tamponi adatti comprendono, per esempio acido borico, bicarbonato di sodio e potassio, borati di sodio e potas-

sio, carbonato di sodio e potassio, acetato di sodio e bifosfato di sodio, in quantità sufficienti a mantenere il pH tra circa 6 e 8, e preferibilmente tra circa 7 e 7,5. Agenti di tonicità adatti sono destrano 40, destrano 70, destrosio, glicerina, cloruro di potassio, propilenglicole e cloruro di sodio.

Antiossidanti e stabilizzanti adatti comprendono bisolfito di sodio, metabisolfito di sodio, tiosolfito di sodio e tiourea. Agenti umettanti e chiarificanti adatti comprendono polisorbato 80, polisorbato 20, polossamero 282 e tilossapolo. Agenti che aumentano la viscosità adatti comprendono destrano 40, destrano 70, gelatina, glicerina, idrossietilcellulosa, idrossimetilpropilcellulosa, lanolina, metilcellulosa, petrolato, polietilenglicole, alcool polivinilico, polivinilpirrolidone e carbossimetilcellulosa. La preparazione può venire somministrata topicamente nell'occhio del soggetto che necessita del trattamento (per esempio un soggetto affetto da AMD) mediante metodi convenzionali, per esempio in forma di gocce, oppure mediante lavaggio dell'occhio in una soluzione terapeutica, contenente una o più composizioni.

Inoltre, è stata sviluppata una varietà di dispositivi per l'introduzione di farmaci nella cavità vitreale dell'occhio. Per esempio, la pubblicazione

della domanda di brevetto n. 20020026176 descrive un tampone contenente una sostanza farmaceutica che può venire inserito attraverso la sclera in modo tale da sporgere nella cavità vitreale per somministrare l'agente farmaceutico nella cavità vitreale. In un altro esempio, il brevetto U.S. n. 5.443.505 descrive un dispositivo impiantabile per l'introduzione in uno spazio sovracoroidale oppure in una regione avascolare per rilascio prolungato del farmaco nella parte inferiore dell'occhio. I brevetti U.S. numeri 5.773.019 e 6.001.386 descrivono ciascuno un dispositivo per la somministrazione di un farmaco impiantabile fissabile alla superficie sclerale dell'occhio. Il dispositivo comprende un nucleo interno contenente una quantità efficace di un agente a bassa solubilità coperto da un polimero non bioerodibile che è permeabile all'agente a bassa solubilità. Durante l'operazione, l'agente a bassa solubilità permea il coperchio di polimero bioerodibile per rilascio prolungato del dispositivo. Altri metodi e dispositivi (per esempio un cerotto trans-sclerale e la somministrazione attraverso lenti a contatto) per la somministrazione di un agente terapeutico all'occhio vengono descritti, per esempio, in Ambati and Adamis (2002) Prog Retin Eye Res 21(2):145-151; Ranta and Urtti

(2006) Adv Drug Delivery Rev 58(11):1164-1181; Barocas and Balachandran (2008) Expert Opin Drug Delivery 5(1):1-10(10); Gulsen and Chauhan (2004) Invest Ophthalmol Vis Sci 45:2342-2347; Kim et al. (2007) Ophthalmic Res 39:244-254; e pubblicazione PCT n. WO 04/073551.

Come descritto in precedenza, possono venire realizzate composizioni con concentrazioni relativamente alte. Per esempio, le composizioni possono venire formulate ad una concentrazione tra circa 10 mg/ml e circa 100 mg/ml (per esempio tra circa 9 mg/ml e 90 mg/ml; tra circa 9 mg/ml e 50 mg/ml; tra circa 10 mg/ml e 50 mg/ml; tra circa 15 mg/ml e 50 mg/ml; tra circa 15 mg/ml e 110 mg/ml; tra circa 15 mg/ml e 100 mg/ml; tra circa 20 mg/ml e 100 mg/ml; tra circa 20 mg/ml e 80 mg/ml; tra circa 25 mg/ml e 100 mg/ml; tra circa 25 mg/ml e 85 mg/ml; tra circa 20 mg/ml e 50 mg/ml; tra circa 25 mg/ml e 50 mg/ml; tra circa 30 mg/ml e 100 mg/ml; tra circa 30 mg/ml e 50 mg/ml; tra circa 40 mg/ml e 100 mg/ml; oppure tra circa 50 mg/ml e 100 mg/ml). In alcune forme di realizzazione, le composizioni possono venire formulate ad una concentrazione maggiore di 5 mg/ml ed inferiore a 50 mg/ml. Metodi per la formulazione di una proteina in una soluzione acquosa sono noti nella tecni-

ca e vengono descritti, per esempio, nel brevetto U.S. n. 7.390.786; McNally and Hastedt (2007), "Protein Formulation and Delivery", Second Edition, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Volume 175, CRC Press; and Banga (2005), "Therapeutic peptides and proteins: formulation, processing, and delivery systems, Second Edition" CRC Press. In alcune forme di realizzazione, la soluzione acquosa ha un pH neutro, per esempio un pH tra 6,5 e 8 (per esempio tra e comprensivo di 7 e 8). In alcune forme di realizzazione, la soluzione acquosa ha un pH di circa 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, oppure 8,0. In alcune forme di realizzazione, la soluzione acquosa ha un pH maggiore di (oppure uguale a) 6 (per esempio, maggiore di, oppure uguale a 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8 oppure 7,9), ma inferiore a pH 8.

Gli acidi nucleici che codificano per un polipeptide terapeutico possono venire incorporati in un costrutto genico da usare come parte di un protocollo di terapia genica per la somministrazione di acidi nucleici che possono venire usati per esprimere e produrre agenti all'interno delle cellule. I costrutti di espressione di tali componenti possono venire

somministrati in qualsiasi veicolo terapeuticamente efficace, per esempio qualsiasi formulazione o composizione in grado di somministrare in modo efficace il gene componente alle cellule in vivo. Gli approcci comprendono l'inserimento del gene in oggetto in vettori virali comprendenti retrovirus ricombinanti, adenovirus, virus adeno-associati, lentivirus e virus dell'herpes simplex 1 (HSV-1), oppure plasmidi batterici o eucarioti ricombinanti. I vettori virali possono trasfettare le cellule direttamente; il DNA plasmide può venire somministrato con il contributo di, per esempio, liposomi cationici (lipofectina) o derivatizzati, coniugati di polilisinina, gramicidina S, membrane pericapsidiche virali artificiali oppure altri veicoli intracellulari, come pure iniezione diretta del costrutto genico o precipitazione di CaPO_4 (si veda per esempio W004/060407) effettuati in vivo. (Si vedano inoltre, "Approcci ex vivo" in quanto segue.) Esempi di retrovirus adatti comprendono pLJ, pZIP, pWE e pEM che sono noti agli esperti del settore (si vedano per esempio Eglitis et al. (1985) *Science* 230:1395-1398; Danos and Mulligan (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6460-6464; Wilson et al. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3014-3018; Armentano et al. (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6141-6145; Huber et

al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:8039-8043; Ferry et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:8377-8381; Chowdhury et al. (1991) Science 254:1802-1805; van Beusechem et al. (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:7640-7644; Kay et al. (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Dai et al. (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:10892-10895; Hwu et al. (1993) J Immunol 150:4104-4115; brevetti U.S. n. 4.868.116 e 4.980.286; e pubblicazioni PCT numeri WO89/07136, WO89/02468, WO89/05345 e WO92/07573). Un altro sistema di somministrazione genica virale utilizza vettori adenovirus-derivati (si vedano per esempio, Berkner et al. (1988) BioTechniques 6:616; Rosenfeld et al. (1991) Science 252:431-434; e Rosenfeld et al. (1992) Cell 68:143-155). Vettori adenovirali adatti derivati dal ceppo Ad dell'adenovirus tipo 5 dl324 oppure altri ceppi di adenovirus (per esempio Ad2, Ad3, Ad7, ecc.) sono noti agli esperti del settore. Un altro sistema ancora di vettore virale utile per la somministrazione del gene in oggetto è il virus adeno-associato (AAV). Si vedano per esempio Flotte et al. (1992) Am J Respir Cell Mol Biol 7:349-356; Samulski et al. (1989) J Virol 63:3822-3828; e McLaughlin et al. (1989) J Virol 62:1963-1973.

In alcune forme di realizzazione, le composizio-

ni possono venire formulate con uno o più di altri agenti terapeutici, per esempio altre terapie per il trattamento o la prevenzione di un disturbo associato al complemento (per esempio un disturbo associato a AP, oppure un disturbo associato a CP) in un soggetto. Altri agenti per il trattamento di un disturbo associato al complemento in un soggetto varieranno a seconda del disturbo particolare che viene trattato, ma possono comprendere, senza limiti, un antiipertensivo (per esempio un inibitore dell'enzima che converte l'angiotensina) [per esempio nel trattamento della sindrome di HELLP], un anticoagulante, un corticosteroide (per esempio prednisone) oppure un agente immunosoppressivo (per esempio vincristina oppure ciclosporina A). Esempi di anticoagulanti comprendono, per esempio, warfarin (Coumadin[®]), aspirina, eparina, fenindione, fondaparinux, idraparinux, e inibitori della trombina (per esempio argatroban, lepirudina, bivalirudina oppure dabigatran). Una composizione descritta in questa sede può venire anche formulata con un agente fibrinolitico (per esempio anicrod, acido ϵ -amminocaproico, antiplasmina- α_1 , prostaciclina e defibrotide) per il trattamento di un disturbo associato al complemento. In alcune forme di realizzazione, una composizione può venire formulata

con un agente di diminuzione lipidica come un inibitore della idrossimetilglutaril-CoA-reduttasi. In alcune forme di realizzazione, una composizione può venire formulata con, oppure per l'uso con un agente anti-CD20 come rituximab (Rituxan™; Biogen Idee, Cambridge, MA). In alcune forme di realizzazione, per esempio per il trattamento di RA, la composizione può venire formulata con uno oppure entrambi di infliximab (Remicade®; Centocor, Inc.) e metotrexato (Rheumatrex®, Trexall®). In alcune forme di realizzazione, una composizione descritta in questa sede può venire formulata con un farmaco antinfiammatorio non steroideo (NSAID). Sono disponibili molti NSAIDS differenti, alcuni da banco comprendono ibuprofene (Advil®, Motrin®, Nuprin®) e naprossene (Alleve®) e molti altri sono disponibili mediante prescrizione, comprendenti (Mobic®), etodolac (Lodine®), nabumetone (Relafen®), sulindac (Clinoril®), tolementina (Tolectin®), salicilato di colina-magnesio (Trilasate®), diclofenac (Cataflam®, Voltaren®, Arthrotec®), diflusinal (Dolobid®), indometicina (Indocin®), Ketoprofen (Orudis®, Oruvail®), Oxaprozin (Daypro®) e piroxicam (Feldene®). In alcune forme di realizzazione, una composizione può venire formulata per l'uso con un anti-ipertensivo, un agente anti-colpo apoplettico (per esem-

pio solfato di magnesio) oppure un agente anti-trombotico. Gli anti-ipertensivi comprendono, per esempio, labetalol, idralzina, nifedipina, antagonisti del canale del calcio, nitroglicerina oppure nitroprussiato di sodio (si vedano per esempio Mihi et al. (2007) J Gastrointestin Liver Dis 16(4):419-424.) Agenti anti-trombotici comprendono, per esempio, eparina, antitrombina, prostaciclina oppure aspirina a bassa dose.

In alcune forme di realizzazione, le composizioni formulate per somministrazione intrapolmonare possono comprendere almeno un altro agente attivo per il trattamento di un disturbo polmonare. L' almeno un agente attivo può essere, per esempio, un anticorpo anti-IgE (per esempio omalizumab), un anticorpo anti-IL-4 oppure un anticorpo anti-IL-5, un inibitore anti-IgE (per esempio montelukast sodico), un simpatomimetico (per esempio albuterolo), un antibiotico (per esempio tobramicina), una deossiribonucleasi (per esempio Pulmozyme®), un farmaco anticolinergico (per esempio bromuro di ipratropio), un corticosteroide (per esempio desametasone), un agonista del β -adrenorecettore, un inibitore del leucotriene (per esempio zileuton), un inibitore della 5-lipossigenasi, un inibitore di PDE, un antagonista di CD23,

un antagonista di IL-13, un inibitore del rilascio della citochina, un antagonista del recettore dell'istamine H1, un anti-istaminico, un agente antinfiammatorio (per esempio cromolina sodica) oppure un inibitore del rilascio dell'istamina.

In alcune forme di realizzazione, le composizioni possono venire formulate per somministrazione con uno o più di altri agenti terapeutici per l'uso nel trattamento di un disturbo dell'occhio associato al complemento. Tali altri agenti terapeutici possono essere, per esempio, bevacizumab oppure il frammento Fab di bevacizumab o ranibizumab, entrambi commercializzati dalla Roche Pharmaceuticals, Inc., e pegaptanib sodico (Mucogen[®]; Pfizer, Inc.). Tale kit può comprendere inoltre, opzionalmente, istruzioni per la somministrazione della composizione ad un soggetto.

In alcune forme di realizzazione, le composizioni possono venire formulate per somministrazione ad un soggetto unitamente ad una terapia con gammaglobulina intravenosa (IVIG), plasmaferesi, sostituzione del plasma oppure scambio del plasma. In alcune forme di realizzazione, le composizioni possono venire formulate per l'uso prima, durante oppure dopo un trapianto di rene.

Quando le composizioni devono venire usate in

combinazione con un secondo agente attivo, le composizioni possono venire co-formulate con il secondo agente attivo oppure le composizioni possono venire formulate separatamente dalla formulazione del secondo agente. Per esempio, le rispettive composizioni farmaceutiche possono venire miscelate, per esempio appena prima della somministrazione, e somministrate insieme, oppure possono venire somministrate separatamente, per esempio allo stesso tempo oppure in momenti differenti (si veda in quanto segue).

Applicazioni

Le composizioni descritte in questa sede possono venire usate in numerose applicazioni diagnostiche e terapeutiche. Per esempio, le molecole leganti l'antigene marcate in modo rilevabile possono venire usate in saggi per rilevare la presenza oppure la quantità degli antigeni marcati in un campione (per esempio un campione biologico). Le composizioni possono venire usate in saggi in vitro per studiare l'inibizione della funzione dell'antigene bersaglio. In alcune forme di realizzazione, per esempio in cui le composizioni si legano a, ed inibiscono una proteina del complemento, le composizioni possono venire usate come controlli positivi in saggi previsti per identificare altri composti nuovi che inibiscono l'attività

del complemento oppure sono diversamente utili per trattare un disturbo associato al complemento. Per esempio, una composizione che inibisce C5 può venire usata come controllo positivo in un saggio per identificare altri composti (per esempio molecole piccole, aptameri oppure anticorpi) che riducono o eliminano la produzione di C5 o la formazione di MAC. Le composizioni possono venire inoltre usate in metodi terapeutici, come approfondito in quanto segue.

Metodi di trattamento

Le composizioni descritte in questa sede possono venire somministrate ad un soggetto, per esempio un soggetto umano, usando una varietà di metodi che dipendono, in parte, dalla via di somministrazione. La via può essere, per esempio, iniezione oppure infusione intravenosa (IV), iniezione sottocutanea (SC) iniezione intraperitoneale (IP) oppure iniezione intramuscolare (IM).

La somministrazione sottocutanea può venire realizzata per mezzo di un dispositivo. I mezzi dispositivi possono essere una siringa, una siringa pre-riempita, un auto-iniettore monouso oppure riutilizzabile, un iniettore a penna, un iniettore a cerotto, un iniettore usurabile, una pompa ad infusione per siringa da ambulatorio con gruppi di infusione sotto-

cutanea oppure altri dispositivi per combinazione con il farmaco anticorpo per iniezione sottocutanea.

La somministrazione può venire ottenuta, per esempio, mediante infusione locale, iniezione oppure per mezzo di un impianto. L'impianto può essere di un materiale poroso, non poroso oppure gelatinoso, comprendente membrane, come membrane elastiche, o fibre. L'impianto può venire configurato per rilascio prolungato o periodico della composizione al soggetto. Si vedano per esempio, la pubblicazione della domanda di brevetto U.S. n. 20080241223; brevetti U.S. numeri 5.501.856; 4.863.457; e 3.710.795; EP488401; e EP 430539. Una composizione descritta in questa sede può venire somministrata ad un soggetto mediante un dispositivo impiantabile basato su sistemi per esempio diffusivi, erodibili oppure convettivi, come pompe osmotiche, impianti biodegradabili, sistemi di elettrodifusione, sistemi di elettro-osmosi, pompe a pressione di vapore, pompe elettrolitiche, pompe effervescenti, pompe piezoelettriche, sistemi a base di erosione oppure sistemi elettromeccanici.

In alcune forme di realizzazione, una composizione descritta in questa sede viene somministrata terapeuticamente ad un soggetto mediante somministrazione locale. Le espressioni usate in questa sede

"somministrazione locale" oppure "rilascio locale" si riferiscono ad una somministrazione che non si basa sul trasporto della composizione o dell'agente al suo tessuto o sito bersaglio previsti mediante il sistema vascolare. Per esempio, la composizione può venire somministrata mediante iniezione o impianto della composizione o agente oppure mediante iniezione o impianto di un dispositivo contenente la composizione o l'agente. Dopo la somministrazione locale in prossimità del tessuto o sito bersaglio, la composizione o agente, oppure uno o più dei suoi componenti, possono diffondersi nel tessuto o sito bersaglio previsto.

In alcune forme di realizzazione, una composizione descritta in questa sede può venire somministrata localmente ad un'articolazione (per esempio un giunto articolato). Per esempio, in forme di realizzazione in cui il disturbo è l'artrite, una composizione terapeuticamente appropriata può venire somministrata direttamente ad un'articolazione (per esempio in uno spazio dell'articolazione) oppure in prossimità dell'articolazione. Esempi di articolazioni intra-articolari alle quali la composizione descritta in questa sede può venire somministrata localmente comprendono, per esempio, articolazione dell'anca, del ginocchio, del gomito, del polso, sterno-cla-

vicolare, temporomandibolare, carpale, tarsale, della caviglia e qualsiasi altra articolazione in oggetto in condizioni artritiche. Una composizione descritta in questa sede può venire anche somministrata ad una borsa, come per esempio, borsa acromiale, bicipitoradiale, cubitoradiale, deltoide, infrapatellare, ischiare e qualsiasi altra borsa nota nel campo della medicina.

In alcune forme di realizzazione, una composizione descritta in questa sede può venire somministrata localmente nell'occhio. Il termine "occhio" usato in questa sede si riferisce a qualsiasi ed a tutte le strutture ed i tessuti anatomici associati all'occhio. L'occhio ha una parete costituita da tre strati distinti: la sclera esterna, la coroide che è lo strato medio, e la retina interna. La camera dietro al cristallino è riempita di un fluido gelatinoso, definito umor vitreo. Nella parte posteriore dell'occhio vi è la retina, che rileva la luce. La cornea è un tessuto otticamente trasparente, che trasporta le immagini verso la parte posteriore dell'occhio. La cornea comprende un percorso per la permeazione dei farmaci nell'occhio. Altre strutture tissutali anatomiche associate all'occhio comprendono il sistema di drenaggio lacrimale, che comprende un

sistema secretivo, un sistema distributivo ed un sistema escretivo. Il sistema secretivo comprende dei secretori che vengono stimolati dal battito delle palpebre e dal cambiamento di temperatura dovuto all'evaporazione delle lacrime, e secretori di riflesso che hanno un impulso del nervo parasimpatico efferente e secernono lacrime in risposta ad una stimolazione fisica e emotiva. Il sistema distributivo comprende le palpebre ed il menisco lacrimale attorno ai bordi delle palpebre, che diffonde le lacrime sulla superficie oculare mediante il battito, riducendo così lo sviluppo di zone secche.

In alcune forme di realizzazione, la composizione descritta in questa sede viene somministrata alla camera posteriore dell'occhio. In alcune forme di realizzazione, la composizione descritta in questa sede viene somministrata per via intravitreale. In alcune forme di realizzazione, la composizione descritta in questa sede viene somministrata per via trans-sclerale.

In alcune forme di realizzazione, per esempio in forme di realizzazione per il trattamento o la prevenzione di un disturbo come COPD o asma, la composizione descritta in questa sede può venire somministrata ad un soggetto per mezzo del polmone. La som-

ministrato polmonare dei farmaci può venire ottenuta mediante inalazione, e la somministrazione mediante inalazione in questa sede può essere orale e/oppure nasale. Esempi di dispositivi farmaceutici per somministrazione polmonare comprendono inalatori con dosi misurate, inalatori di polvere anidra (DPI) e nebulizzatori. Per esempio, la composizione descritta in questa sede può venire somministrata ai polmoni di un soggetto per mezzo di un inalatore di polvere anidra. Questi inalatori sono dispositivi privi di propellente che somministrano ai polmoni formulazioni di polvere anidra disperdibili e stabili. Gli inalatori di polvere anidra sono ben noti nella medicina, e comprendono, senza limiti, TurboHaller[®] (AstraZeneca; London, England) l'inalatore AIR[®] (Alkermes[®]; Cambridge, Massachusetts); Rotahaler[®] (GlaxoSmithKline; London, England); e Eclipse[™] (Sanofi-Aventis; Paris, France). Si vedano inoltre per esempio le pubblicazioni PCT numeri WO 04/026380, WO 04/024156 e WO 01/78693. I dispositivi di DPI vengono usati per somministrazione polmonare di polipeptidi come l'insulina e l'ormone della crescita. In alcune forme di realizzazione, la composizione descritta in questa sede può venire somministrata per via intrapolmonare mediante un inalatore con dosi misurate.

Questi inalatori si basano su un propellente per somministrare una dose separata di un composto ai polmoni. Esempi di composti somministrati mediante inalatori con dosi misurate comprendono, per esempio, Astovent[®] (Boehringer-Ingelheim; Ridgefield, Connecticut) e Flovent[®] (GlaxoSmithKline). Si vedano inoltre, per esempio, i brevetti U.S. numeri 6.170.717; 5.447.150; e 6.095.141.

In alcune forme di realizzazione, la composizione descritta in questa sede può venire somministrata ai polmoni di un soggetto per mezzo di un nebulizzatore. I nebulizzatori usano aria compressa per somministrare un composto come aerosol o nebbia liquefatta. Un nebulizzatore può essere, per esempio, un nebulizzatore a getto (per esempio nebulizzatori a getto di aria o di liquidi) oppure un nebulizzatore a ultrasuoni. Altri dispositivi e metodi di somministrazione intrapolmonare sono esposti nelle pubblicazioni delle domande di brevetto U.S. numeri 20050271660 e 20090110679.

In alcune forme di realizzazione, le composizioni fornite in questa sede sono presenti in forme di dosaggio unitario, che possono essere particolarmente adatte per auto-somministrazione. Un prodotto formulato della presente descrizione può venire compreso

all'interno di un contenitore, tipicamente per esempio una provetta, una cartuccia, una siringa pre-riempita oppure una penna monouso. Un dosatore come il dispositivo dosatore descritto nel brevetto U.S. n. 6.302.855 può venire anche usato, per esempio, con un sistema a iniezione della presente descrizione.

Un sistema a iniezione della presente descrizione può utilizzare una penna di somministrazione descritta nel brevetto U.S. n. 5.308.341. Dispositivi a penna, usati più comunemente per l'auto-somministrazione di insulina in pazienti diabetici, sono ben noti nella tecnica. Tali dispositivi possono comprendere almeno un ago per iniezione (per esempio un ago numero 31 avente una lunghezza da circa 5 a 8 mm), vengono tipicamente pre-riempiti con una o più dosi di unità terapeutiche di una soluzione terapeutica, e sono utili per somministrazione rapida della soluzione ad un soggetto con un dolore il più lieve possibile.

Una penna per somministrazione di un medicamento comprende un supporto per la provetta in cui può venire ricevuta una provetta per insulina o per un altro medicamento. Il supporto per provetta è una struttura allungata generalmente tubolare con estremità prossimali e distali. L'estremità distale del

supporto per la provetta comprende mezzi di montaggio per impegnare una cannula per ago a doppia punta. L'estremità prossimale comprende anche mezzi di montaggio per impegnare il corpo della penna che comprende un azionatore ed un dispositivo per la regolazione della dose. Una provetta monouso contenente un medicamento (per esempio una soluzione ad alta concentrazione di una composizione descritta in questa sede) per l'uso con il supporto per provette della tecnica nota comprende un'estremità distale avente un setto elastomerico perforabile che può venire perforato da un'estremità di una cannula con ago a doppia punta. L'estremità prossimale di questa provetta comprende una chiusura disposta in modo scorrevole in impegno a tenuta di liquido con la parete cilindrica della provetta. Questa penna di somministrazione del medicamento viene usata inserendo la provetta con il medicamento nel supporto per la provetta. Il corpo della penna viene collegato quindi all'estremità prossimale del supporto della provetta. Il corpo della provetta comprende un dispositivo per la regolazione della dose per indicare la dose di medicamento che deve venire somministrata dalla penna ed un dispositivo attuatore per spingere la chiusura della provetta distalmente per una distanza che corrisponde

alla dose selezionata. L'utilizzatore della penna monta una cannula con ago a doppia punta nell'estremità distale del supporto della provetta in modo tale che il punto prossimale della cannula per l'ago perfori il setto sulla provetta. Il paziente sceglie quindi una dose e fa funzionare la penna per spingere la chiusura distalmente per la somministrazione della dose selezionata. Il dispositivo per la selezione della dose ritorna a zero dopo l'iniezione della dose selezionata. Il paziente quindi rimuove ed elimina la cannula con l'ago e mantiene la penna di somministrazione del medicamento in una posizione conveniente per la successiva somministrazione di medicamento richiesta. Il medicamento nella provetta si esaurirà dopo diverse somministrazioni di medicamento. Il paziente separa quindi il supporto per la provetta dal corpo della penna. La provetta vuota può venire quindi rimossa ed eliminata. Può venire inserita una nuova provetta nel supporto per la provetta, ed il supporto per la provetta ed il corpo della penna possono venire riassembleati ed usati come spiegato in precedenza. Pertanto, una penna per la somministrazione del medicamento presenta generalmente un meccanismo di azionamento per somministrazione accurata e facilità di uso.

Un meccanismo di dosaggio come una levetta ruotabile consente all'utilizzatore di regolare in modo accurato la quantità di medicamento che verrà iniettata mediante la penna da una provetta preconfezionata con il medicamento. Per iniettare la dose di medicamento, l'utilizzatore inserisce l'ago sotto la pelle e preme la levetta una volta fino al punto di arresto. La penna può essere un dispositivo completamente meccanico oppure può venire combinata con un circuito elettronico per regolare e/oppure indicare accuratamente il dosaggio di medicamento che viene iniettato nell'utilizzatore, Si veda per esempio il brevetto U.S. n. 6.192.891.

In alcune forme di realizzazione, l'ago del dispositivo a penna è monouso ed il kit comprende uno o più aghi monouso per la sostituzione. Dispositivi a penna adatti per somministrazione di una qualsiasi delle composizioni mostrate nella presente sono anche descritti, per esempio nei brevetti U.S. numeri 6.277.099; 6.200.296; e 6.146.361. Un dispositivo a penna a base di microaghi viene descritto per esempio nel brevetto U.S. n. 7.556.615. Si veda inoltre il dispositivo Precision Pen Injector (PPI), Molly™, prodotto dalla Scandinavian Health Ltd.

La presente descrizione presenta inoltre formu-

lazioni a rilascio esteso oppure a rilascio controllato adatte per somministrazione cronica e/oppure auto-somministrazione di un medicamento come una composizione descritta in questa sede. Le varie formulazioni possono venire somministrate ad un paziente che necessita del trattamento con il medicamento come bolo oppure mediante infusione continua in un periodo di tempo.

In alcune forme di realizzazione, una composizione ad alta concentrazione descritta in questa sede viene formulata per somministrazione a rilascio prolungato, a rilascio esteso, a rilascio temporizzato, a rilascio controllato oppure a rilascio continuo. In alcune forme di realizzazione, vengono usate formulazioni deposito per somministrare la composizione al soggetto che ne necessita. In questo metodo, la composizione viene formulata con uno o più veicoli che forniscono un rilascio graduale dell'agente attivo in un periodo di tempo di alcune ore o giorni. Tali formulazioni si basano spesso su una matrice di degradazione che si disperde gradualmente nel corpo rilasciando l'agente attivo.

In alcune forme di realizzazione, la composizione descritta in questa sede viene somministrata per via intrapolmonare ad un soggetto che ne necessita.

Per esempio, la composizione descritta in questa sede può venire somministrata per mezzo di un nebulizzatore o di un inalatore ad un soggetto (per esempio l'uomo) affetto da un disturbo come asma o COPD.

Una dose adatta della composizione descritta in questa sede, la quale dose è in grado di trattare o prevenire un disturbo in un soggetto, può dipendere da una varietà di fattori comprendenti, per esempio, l'età, il sesso ed il peso del soggetto da trattare ed il particolare composto inibitore usato. Per esempio, può venire richiesta una dose differente di una composizione (per esempio una composizione anti-C5) per trattare un soggetto con RA in confronto alla dose di una composizione diversa (per esempio una composizione anti-TNF α) richiesta per trattare lo stesso soggetto. Altri fattori che influiscono sulla dose somministrata al soggetto comprendono, per esempio, il tipo di gravità del disturbo. Per esempio, un soggetto avente RA può richiedere la somministrazione di un dosaggio differente di una composizione anti-C5 descritta in questa sede rispetto ad un soggetto con PNH. Altri fattori possono comprendere, per esempio, altri disturbi medicali che affliggono contemporaneamente oppure che affliggevano in precedenza il soggetto, la salute generale del soggetto, la disposi-

zione genetica del soggetto, il tempo di somministrazione, la velocità di escrezione, la combinazione di farmaci e di qualsiasi altro agente terapeutico aggiuntivo che viene somministrato al soggetto. Si deve comprendere inoltre che un dosaggio specifico ed un regime di trattamento specifico per un particolare soggetto dipenderanno anche dal giudizio del medico professionista che tratta il soggetto (per esempio il dottore o l'infermiere).

La composizione descritta in questa sede può venire somministrata come dose fissa, oppure in una dose di un milligrammo per chilogrammo (mg/kg). In alcune forme di realizzazione, la dose può venire anche scelta per ridurre oppure impedire la produzione di anticorpi o di altre risposte immunitarie da parte dell'ospite contro una o più delle molecole leganti l'antigene della composizione. Sebbene in nessun modo intendano essere limitanti, dosaggi esemplificativi di un anticorpo, come una composizione descritta in questa sede, comprendono, per esempio, 1-1000 mg/kg, 1-100 mg/kg, 0,5-50 mg/kg, 0,1-100 mg/kg, 0,5-25 mg/kg, 1-20 mg/kg e 1-10 mg/kg.

Dosaggi esemplificativi di una composizione descritta in questa sede comprendono, senza limiti, 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4 mg/kg, 8

mg/kg oppure 20 mg/kg.

Una soluzione farmaceutica può comprendere una quantità terapeuticamente efficace di una composizione descritta in questa sede. Tali quantità efficaci possono venire facilmente determinate da un esperto del settore che si basa in parte sull'effetto della composizione somministrata, oppure sull'effetto combinatoriale della composizione e di uno o più di altri agenti attivi, se viene usato più di un agente. Una quantità terapeuticamente efficace di una composizione descritta in questa sede può anche variare a seconda di fattori come lo stato della malattia, l'età, il sesso ed il peso dell'individuo, e la capacità della composizione (e di uno o più di altri agenti attivi) di stimolare la risposta desiderata nell'individuo, per esempio il miglioramento di almeno una parametro della condizione, per esempio il miglioramento di almeno un sintomo del disturbo mediato dal complemento. Per esempio, una quantità terapeuticamente efficace di una composizione descritta in questa sede può inibire (ridurre la gravità di, oppure eliminare la comparsa di) e/oppure prevenire un disturbo particolare, e/oppure uno qualsiasi dei sintomi del disturbo particolare noto nella tecnica oppure descritto in questa sede. Una quantità terapeutica-

ticamente efficace è anche una quantità in cui qualsiasi effetto tossico o negativo della composizione viene superato dagli effetti terapeuticamente vantaggiosi.

Dosi adatte per l'uomo di qualsiasi delle composizioni descritte in questa sede possono venire inoltre valutate, per esempio, in studi sull'aumento della dose di fase I. Si vedano per esempio van Gurp et al. (2008) *Am J Transplantation* 8(8):1711-1718; Hahnouska et al. (2007) *Clin Cancer Res* 13(2, parte 1):523-531; e Hetherington et al. (2006) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(10):3499-3500.

Le espressioni "quantità terapeuticamente efficace" oppure "dose terapeuticamente efficace" o termini simili usati in questa sede intendono significare una quantità di un agente (per esempio la composizione descritta in questa sede) che stimolerà la risposta biologica o medica desiderata (per esempio un miglioramento di uno o più dei sintomi di un disturbo associato al complemento). In alcune forme di realizzazione, la soluzione farmaceutica descritta in questa sede contiene una quantità terapeuticamente efficace di almeno una di dette composizioni. In alcune forme di realizzazione, le soluzioni contengono una o più composizioni ed uno o più di altri agenti

terapeutici (per esempio due, tre, quattro, cinque, sei, sette, otto, nove, 10 oppure 11 o più) in modo tale che la composizione nell'insieme sia terapeuticamente efficace. Per esempio, una soluzione può contenere una composizione anti-C5 descritta in questa sede ed un agente immunosoppressivo, in cui la composizione e l'agente hanno ciascuno una concentrazione tale che, quando combinate, sono terapeuticamente efficaci per il trattamento o la prevenzione di un disturbo associato al complemento (per esempio un disturbo infiammatorio come COPD, asma, sepsi oppure RA) in un soggetto.

La tossicità e l'efficacia terapeutica di tali composizioni possono venire determinate mediante procedure farmaceutiche note in colture cellulari o in esperimenti su animali (per esempio modelli di animali di qualsiasi dei disturbi associati al complemento descritti in questa sede). Queste procedure possono venire usate per esempio per determinare la LD₅₀ (la dose letale per il 50% della popolazione) e la ED₅₀ (la dose terapeuticamente efficace per il 50% della popolazione). Il rapporto nelle dosi tra gli effetti tossici e gli effetti terapeutici è l'indice terapeutico e può venire espresso come rapporto LD₅₀/ED₅₀. Viene preferita una composizione descritta in questa

sede che presenti un indice terapeutico elevato. Sebbene possano venire usate composizioni che presentano effetti collaterali tossici, si deve prestare attenzione a progettare un sistema di somministrazione che indirizzi tali composti al sito di tessuto colpito e a minimizzare i potenziali danni alle cellule normali, e quindi ridurre gli effetti collaterali.

I dati ottenuti dai saggi di coltura cellulare e dagli studi sugli animali possono venire usati per formulare un campo di dosaggi per l'uso nell'uomo. Il dosaggio della composizione descritta in questa sede si trova generalmente in un campo di concentrazioni in circolazione delle composizioni che comprendono l'ED₅₀ con poca tossicità o senza alcuna tossicità. Il dosaggio può variare entro questo campo a seconda della forma di dosaggio utilizzata e dalla via di somministrazione utilizzata. Per una composizione descritta in questa sede, la dose terapeuticamente efficace può venire valutata inizialmente mediante saggi di coltura cellulare. Una dose può venire formulata in modelli di animali per ottenere un campo di concentrazioni circolanti nel plasma che comprende la IC₅₀ (vale a dire la concentrazione dell'anticorpo necessaria per ottenere un'inibizione massima della metà dei sintomi) determinata nella coltura cellula-

re. Tale informazione può venire usata per determinare in modo più accurato dosi utili per l'uomo. I livelli nel plasma possono venire misurati, per esempio, mediante cromatografia liquida ad elevata prestazione. In alcune forme di realizzazione, per esempio, in cui si desidera la somministrazione locale (per esempio all'occhio o ad un'articolazione), la coltura cellulare o il modello animale possono venire usati per determinare la dose richiesta per ottenere una concentrazione terapeuticamente efficace all'interno del sito locale.

In alcune forme di realizzazione, i metodi possono venire effettuati unitamente ad altre terapie per disturbi associati al complemento. Per esempio, la composizione può venire somministrata ad un soggetto contemporaneamente, prima di, oppure dopo la plasmaferesi, la terapia con IVIG oppure lo scambio del plasma. Si vedano per esempio Appel et al. (2005) *J Am Soc Nephrol* 16:1392-1404. In alcune forme di realizzazione, la composizione può venire somministrata ad un soggetto contemporaneamente, prima di, oppure dopo un trapianto di rene.

Il termine "soggetto" usato in questa sede può indicare qualsiasi mammifero. Per esempio, un soggetto può essere un uomo, un primate non umano (per

esempio orangotango, gorilla, macaco, babbuino oppure scimpanzé), un cavallo, una mucca, un maiale, una pecora, una capra, un cane, un gatto, un coniglio, un porcellino d'India, un gerbillo, un criceto, un ratto oppure un topo. In alcune forme di realizzazione, il soggetto è un bambino (per esempio un bambino umano).

Le espressioni usate in questa sede "che necessita della prevenzione", "che necessita del trattamento" oppure "che necessita dello stesso" si riferiscono ad una persona che, secondo il giudizio di un medico specialista adatto (per esempio un dottore, un infermiere oppure un medico infermiere nel caso dell'uomo; un veterinario nel caso di mammiferi non umani) potrà trarre ragionevolmente vantaggio da un dato trattamento.

Il termine "prevenzione" viene riconosciuto nella tecnica, e quando usato in riferimento ad una condizione, è ben noto nella tecnica, e comprende la somministrazione di una composizione che riduce la frequenza di, oppure ritarda l'inizio dei sintomi di una condizione medica in un soggetto rispetto ad un soggetto che non riceve la composizione descritta in questa sede. Quindi, la prevenzione di un disturbo associato al complemento, come asma, comprende, per esempio, la riduzione dell'entità o della frequenza

della tosse, dei rantoli o del dolore al petto in una popolazione di pazienti che riceve un trattamento profilattico rispetto ad una popolazione di controllo non trattata, e/oppure il ritardo della comparsa della tosse o del rantolo in una popolazione trattata rispetto ad una popolazione di controllo non trattata, per esempio mediante una quantità statisticamente e/oppure clinicamente significativa.

Come descritto in precedenza, le composizioni descritte in questa sede (per esempio composizioni anti-C5) possono venire usate per trattare una varietà di disturbi associati al complemento come, ma non limitati a questi, artrite reumatoide (RA); nefrite lupica; danno da ischemia/riperfusione; sindrome emolitico-uremica atipica (aHUS); sindrome emolitico-uremica tipica oppure infettiva (tHUS); malattia da depositi densi (DDD); emoglobinuria parossistica notturna (PNH); sclerosi multipla (MS); degenerazione maculare (per esempio degenerazione maculare correlata all'età (AMD)); emolisi, enzimi epatici elevati e sindrome da piastrine basse (HELLP); sepsi; dermatomiositi; retinopatia diabetica; porpora trombotica trombocitopenica (TTP); aborto spontaneo; vasculite pauci-immune; epidermolisi bollosa; aborto ripetuto; sclerosi multipla (MS); danno cerebrale traumatico.

Si vedano per esempio Holers (2008) Immunological Reviews 223:300-316 and Holers and Thurman (2004) Molecular Immunology 41:147-152. In alcune forme di realizzazione, il disturbo mediato dal complemento è un disturbo vascolare mediato dal complemento come, ma non limitato a questi, disturbo cardiovascolare, miocardite, disturbo cerebrovascolare, disturbo vascolare periferico (per esempio muscolo-scheletrico), disturbo renovascolare, disturbo vascolare mesenterico/enterico, rivascolarizzazione per i trapianti e/oppure i reimpianti, vasculite, nefrite porpora di Henoch-Schonlein, vasculite associata a lupus eritematoso sistemico, vasculite associata ad artrite reumatoide, vasculite del complesso immune, malattia di Takayasu, sindrome da perdita capillare, cardiomiopatia dilatativa, angiopatia diabetica, aneurisma aortico toracico-addominale, malattia di Kawasaki (arterite), embolia gassosa venosa (VGE) e restenosi in seguito a posizionamento dello stent, aterectomia rotazionale e angioplastica coronarica transluminale percutanea (PICA) (si veda per esempio la pubblicazione della domanda di brevetto U.S. n. 20070172483). In alcune forme di realizzazione, il disturbo associato al complemento è miastenia gravis, malattia da agglutinine fredda (CAD), emoglobinuria parossistica

da freddo (PCH), dermatomiosite, scleroderma, anemia emolitica autoimmune calda, malattia di Graves, tiroidite di Hashimoto, diabete di tipo I, psoriasi, pemfigo, anemia emolitica autoimmune (AIHA), porpora trombocitopenica idiopatica (ITP), sindrome di Goodpasture, sindrome antifosfolipide (APS), malattia di Degos e APS catastrofica (CAPS).

In alcune forme di realizzazione, la composizione descritta in questa sede, da sola o in combinazione con un secondo agente antinfiammatorio, può venire usata per trattare un disturbo antinfiammatorio come, ma non limitato a questi, RA (si veda in precedenza), malattia infiammatoria dell'intestino, sepsi (si veda in precedenza), shock settico, danni polmonari acuti, coagulazione intravascolare disseminata (DIC) oppure morbo di Crohn. In alcune forme di realizzazione, il secondo agente antinfiammatorio può essere uno scelto dal gruppo costituito da NSAID, corticosteroidi, metotrexato, idrossiclorochina, agenti anti-TNF come etanercept e infliximab, un agente di eliminazione delle cellule B come rituximab, un antagonista della interleuchina-1 oppure un agente di bloccaggio della co-stimolazione delle cellule T come abatacept.

In alcune forme di realizzazione, il disturbo associato al complemento è un disturbo neurologico

associato al complemento, come, ma non limitato a questi, sclerosi laterale amiotrofica (SLA), danno cerebrale, morbo di Alzheimer e neuropatia demielinizzante infiammatoria cronica.

I disturbi associati al complemento comprendono anche disturbi polmonari associati al complemento come, ma non limitati a questi, asma, bronchite, malattia polmonare ostruttiva cronica (COPD), malattia polmonare interstiziale, carenza alfa-1 anti-tripsina α -1, enfisema, bronchiectasia, bronchiolite obliterante, alveolite, sarcoidosi, fibrosi polmonare e malattia vascolare del collagene.

In alcune forme di realizzazione, una composizione descritta in questa sede viene somministrata ad un soggetto per trattare, prevenire oppure migliorare almeno un sintomo di una risposta antinfiammatoria associata al complemento (per esempio un aspetto della risposta antinfiammatoria associata al complemento di un disturbo associato al complemento) in un soggetto. Per esempio, una composizione può venire usata per trattare, prevenire, e/oppure migliorare uno o più sintomi associati alla risposta infiammatoria associata al complemento come malattia del rigetto dell'innesto/ospite verso l'ospite (GVHD), ferite da riperfusione (per esempio in seguito a bypass cardio-

polmonare oppure a trapianto tissutale) e danno tissutale in seguito ad altre forme di lesioni traumatiche come un'ustione (per esempio un'ustione grave), trauma da impatto, ferita spinale oppure gelone. Si vedano per esempio Park et al. (1999) *Anesth Analg* 99(1):42-48; Tofukuji et al. (1998) *J Thorac Cardiovasc Surg* 116(6):1060-1068; Schmid et al. (1997) *Shock* 8(2):119-124; e Bless et al. (1999) *Am J Physiol* 276(1):57-L63.

In alcune forme di realizzazione, la composizione descritta in questa sede può venire somministrata ad un soggetto come monoterapia. In alternativa, come descritto in precedenza, la composizione può venire somministrata ad un soggetto come terapia di combinazione con un altro trattamento, per esempio un altro trattamento per un disturbo associato al complemento oppure una risposta infiammatoria associata al complemento. Per esempio, la terapia di combinazione può comprendere la somministrazione ad un soggetto (per esempio un paziente umano) di uno o più di altri agenti (per esempio farmaci anti-coagulanti, anti-ipertensivi oppure antinfiammatori (per esempio steroidi)) che forniscono un vantaggio terapeutico ad un soggetto che presenta il rischio, oppure è a rischio di sviluppare sepsi. In un altro esempio, la terapia

di combinazione può comprendere la somministrazione al soggetto di uno o più di altri agenti (per esempio un anticorpo anti-IgE, un anticorpo anti-IL-4, un anticorpo anti-IL-5 oppure un antistaminico) che forniscono un vantaggio terapeutico ad un soggetto che presenta il rischio, oppure che è a rischio di sviluppare, oppure che si sospetta che abbia un disturbo polmonare associato al complemento, come COPD oppure asma. In alcune forme di realizzazione, la composizione e l'uno o più di altri agenti attivi vengono somministrati contemporaneamente. In alcune forme di realizzazione, la composizione viene somministrata in un primo tempo, e l'uno o più di altri agenti attivi vengono somministrati in un secondo tempo. In alcune forme di realizzazione, l'uno o più di altri agenti attivi vengono somministrati per primi nel tempo e la composizione viene somministrata in un secondo tempo.

La composizione descritta in questa sede può sostituire oppure aumentare una terapia somministrata in precedenza oppure contemporaneamente. Per esempio, dopo trattamento con una composizione descritta in questa sede, la somministrazione di uno o più di altri agenti attivi può cessare oppure diminuire, per esempio può venire somministrata a livelli inferiori, per esempio livelli inferiori di eculizumab, dopo

somministrazione di una composizione anti-C5 descritta in questa sede. In alcune forme di realizzazione, la somministrazione della terapia precedente può venire mantenuta. In alcune forme di realizzazione, la terapia precedente verrà mantenuta fino a quando il livello della composizione raggiunge un livello sufficiente a fornire l'effetto terapeutico. Le due terapie possono venire somministrate in combinazione.

Monitorare un soggetto (per esempio un paziente umano) per il miglioramento di un disturbo (per esempio sepsi, ustione grave, RA, nefrite lupica, sindrome di Goodpasture oppure asma) definito in questa sede, significa valutare nel soggetto un cambiamento in un parametro della malattia, per esempio un miglioramento di uno o più sintomi di un dato disturbo. I sintomi di molti dei suddetti disturbi (per esempio disturbi associati al complemento) sono ben noti nella tecnica della medicina. In alcune forme di realizzazione, la valutazione viene eseguita almeno un'ora (1), per esempio almeno 2, 4, 6, 8, 12, 24, oppure 48 ore, oppure almeno 1 giorno, 2 giorni, 4 giorni, 10 giorni, 13 giorni, 20 giorni o più, oppure almeno 1 settimana, 2 settimane, 4 settimane, 10 settimane, 13 settimane, 20 settimane o più, dopo la somministrazione di una composizione descritta in questa sede.

Il soggetto può venire valutato in uno o più dei seguenti periodi: prima dell'inizio del trattamento; durante il trattamento; oppure dopo che sono stati somministrati uno o più elementi del trattamento. La valutazione può comprendere valutare la necessità di ulteriori trattamenti, per esempio valutare se un dosaggio, la frequenza della somministrazione oppure la durata del trattamento debbano venire modificati. Essa può anche comprendere la valutazione della necessità di aggiungere oppure diminuire una modalità terapeutica scelta, per esempio aggiungere oppure diminuire qualsiasi dei trattamenti per un disturbo associato al complemento descritto in questa sede.

I seguenti esempi sono solamente illustrativi e non devono venire considerati come limitanti il campo della presente descrizione in alcun modo, poiché molte variazioni ed equivalenti saranno evidenti agli esperti del settore dopo lettura della presente descrizione.

ESEMPI

Esempio 1. La semi-vita di eculizumab è una combinazione di diverse velocità di clearance

La semi-vita media di eculizumab in pazienti affetti da PNH e aHUS che ricevono il regime di dosaggio prescritto è approssimativamente di 11-12 giorni,

mentre si prevede che la semi-vita prevista per un anticorpo monoclonale umanizzato avente un Fc di IgG2/4 sia simile a quella di un anticorpo contenente un Fc di IgG2 oppure IgG4, approssimativamente di 21-28 giorni. Morell et al. (1970) *J Clin Invest* 49(4):673-680. Per capire l'impatto potenziale della clearance mediata dall'antigene sulla velocità di clearance totale di eculizumab, sono stati eseguiti i seguenti esperimenti usando un modello di topi (i topi non presentano FcRn endogeno, ma sono transgenici per hFcRn (B6.Cg-Fcgrt^{tm1Dcr} Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJ; numero nel registro 014565, Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine)) con recettore Fc neonatale umano (hFcRn). Il modello di FcRn transgenico è stato descritto per esempio in Petkova et al. (2006) *Int Immunology* 18(12):1759-1769; Oiao et al. (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 105(27):9337-9342; e Roopenian et al. (2010) *Methods Mol Biol* 602:93-104.

Una dose singola di 100 µg di eculizumab in 200 µl di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) è stata somministrata mediante iniezione intravenosa (i.v.) a ciascuno dei cinque topi transgenici hFcRn. Sono stati prelevati campioni di sangue di approssimativamente 100 µl da ciascuno dei topi nei giorni uno, tre, sette, 14, 21, 28 e 35 dopo la somministra-

zione. La concentrazione di eculizumab nel siero è stata misurata mediante ELISA. In breve, le piastre per i saggi sono state rivestite con un anticorpo di cattura a catena leggera di IGK anti-umano di pecora e bloccate. I pozzetti della piastra sono stati quindi portati a contatto con i campioni di siero in condizioni da permettere a eculizumab, se presente nel siero, di legarsi all'anticorpo di cattura. La quantità relativa di eculizumab legato a ciascun pozzetto è stata rilevata usando un anticorpo IgG4 anti-umano marcato in modo rilevabile e quantificata rispetto ad una curva standard generata da siero di topo mai trattato contenente quantità note di eculizumab.

La semi-vita dell'anticorpo nel siero è stata calcolata usando la formula seguente:

$$\text{Semi-vita} = T \times \frac{\ln 2}{\ln \frac{A_0}{A_t}}$$

in cui: T = tempo trascorso, A_0 = concentrazione originaria nel siero dell'anticorpo (concentrazione al giorno 1 del presente studio) e A_t = quantità di anticorpo rimanente dopo il tempo trascorso T (concentrazione minima rilevabile oppure l'ultimo punto nel tempo di emorragia (giorno 35) nel presente studio).

I risultati dell'esperimento sono rappresentati

nella fig. 1. La semi-vita di eculizumab nel modello di topo con hFcRn era di $13,49 \pm 0,93$ giorni.

Per determinare l'effetto di C5 umano sulla semi-vita di eculizumab usando il modello di hFcRn, l'anticorpo è stato pre-miscelato con un rapporto molare di 4:1 con C5 umano (Complement Technology Inc., numero di catalogo: A120) prima della somministrazione. Una dose di 100 µg di eculizumab è stata somministrata per via intravenosa (i.v.) il giorno 0. Approssimativamente 100 µl di sangue sono stati raccolti in provette Eppendorf da 1,5 ml per il siero mediante emorragia retro-orbitale nei giorni 1, 3, 7, 14, 21, 28 e 35.

Come mostrato nella fig. 1, la semi-vita di eculizumab nel modello di topo con hFcRn in presenza di C5 era di $4,55 \pm 1,02$ giorni. Questi risultati indicano che, oltre ai meccanismi di clearance dell'anticorpo mediati dall'endocitosi in cui una semi-vita lunga viene fortemente controllata dal nuovo ciclo mediato da FcRn, la semi-vita di eculizumab può venire significativamente influenzata dalla clearance mediata dall'antigene attraverso C5 umano.

Esempio 2. Le sostituzioni di amminoacidi nel dominio di Fc di eculizumab aumentano la semi-vita di eculizumab ma non sono sufficienti a superare l'effetto di

C5 sulla clearance di eculizumab

È stato mostrato che certe sostituzioni di amminoacidi nella regione di Fc di un anticorpo IgG diminuiscono la velocità di eliminazione dell'anticorpo dalla circolazione. Le sostituzioni che aumentano l'affinità di legame di un anticorpo IgG per FcRn a pH 6,0 sono esempi di tale effetto biologico. Si vedano per esempio Dall'Acqua et al. (2006) *J Immunol* 117:1129-1138 e Ghetie et al. (1997) *Nat Biotech* 15:637-640. Zalevsky et al. [(2010) *Nat Biotech* 28:157-159] descrivono numerose sostituzioni di amminoacidi, per esempio M428L/N434S, in grado di aumentare la semi-vita di un anticorpo IgG nel siero. Altre sostituzioni di amminoacidi che estendono la semi-vita comprendono, per esempio, T250Q/M428L e M252Y/S254T/T256E. Si vedano per esempio la pubblicazione della domanda di brevetto internazionale n. WO 2008/048545 e Dall'Acqua et al. (2006) *J Biol Chem* 281:23514-23524. Per determinare se una o più sostituzioni di amminoacidi nella regione costante di Fc di eculizumab siano in grado di estendere la semi-vita di eculizumab nel siero, sono state introdotte le seguenti sostituzioni in eculizumab: M252Y/S254T/T256E, sulla base dell'indice di numerazione UE (in questa sede dopo che questa variante di

eculizumab è stata indicata come variante YTE). La regione costante della catena pesante era costituita dalla seguente sequenza di amminoacidi:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT-
FPAVLQSSGLYSLSSVTVTSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCCV-
ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW-
YVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLGKEYKCKVSNKGLP-
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW-
ESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH-
NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID n. 15). La sequenza di amminoacidi per il polipeptide a catena pesante a lunghezza completa della variante YTE di eculizumab viene rappresentata nella SEQ ID n. 16.

La variante YTE è stata valutata insieme a eculizumab nel modello di topo hFcRn descritto nell'esempio 1. Vale a dire che 100 µg di eculizumab (regione di Fc con IgG2/4), una variante di eculizumab contenente Fc oppure la variante YTE di eculizumab in 200 µl di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) sono stati somministrati mediante iniezione intravenosa (i.v.) a ciascuno degli otto topi transgenici hFcRn. Il siero è stato raccolto da ciascuno dei topi nei giorni uno, tre, sette, 14, 21, 28 e 35 dopo la somministrazione. La concentrazione di ciascun anticorpo nel siero è stata misurata mediante

ELISA e la semi-vita è stata calcolata come descritto nell'esempio 1. I risultati vengono rappresentati nella fig. 2 e nella tabella 2.

Tabella 2

<u>Anticorpo testato</u>	<u>Semi-vita</u>	<u>Errore standard (SE)</u>
Eculizumab	13.49	0.93
Eculizumab-IgG2	14.28	1
Eculizumab-IgG2-YTE	29.07	4.7

Come mostrato nella fig. 2 e nella tabella 2, la sostituzione di YTE ha aumentato la semi-vita media di eculizumab di più di 2 volte da $14,28 \pm 1$ giorno a $29,07 \pm 4,7$ giorni.

Per determinare l'effetto di C5 umano sulla semi-vita della variante YTE di eculizumab, ai topi è stato somministrato C5 umano come descritto in precedenza nell'esempio 1. Una dose di 100 µg di eculizumab, la variante di eculizumab-IgG2 oppure la variante YTE di eculizumab-IgG2 sono state somministrate per via intravenosa il giorno 0. Come mostrato nella fig. 3 e nella tabella 3, le semi-vite di eculizumab, della variante di eculizumab-IgG2 e della variante YTE di eculizumab-IgG2 sono diminuite significativamente in presenza di un eccesso molare di C5 umano. Quindi, le sostituzioni di amminoacidi nel dominio

legante FcRn di eculizumab erano insufficienti a superare il contributo della clearance mediata da C5 sulla semi-vita di eculizumab.

Tabella 3

<u>Anticorpo testato</u>	<u>T1/2</u>	<u>Errore standard (SE)</u>
Eculizumab	13.49	0.93
Eculizumab-IgG2	14.28	1
Eculizumab-IgG2(YTE)	29.07	4.7
Eculizumab + hC5	4.55	1.02
Eculizumab-IgG2 + C5	2.11	0.31
Eculizumab-IgG2(YTE) + hC5	4.28	1.09

Esempio 3. Effetto sulla semi-vita delle sostituzioni di amminoacidi nelle CDR di eculizumab

Come descritto in precedenza, la semi-vita di eculizumab nei topi è significativamente più breve in presenza del suo antigene, C5 umano (hC5). Sebbene non si sia legati ad alcuna teoria o meccanismo di azione particolari, si ipotizza che la clearance accelerata in presenza dell'antigene sia, in parte, il risultato dell'affinità molto alta di eculizumab per C5 ($K_D \sim 30$ pM a pH 7,4 e ~ 600 pM a pH 6,0), il che non consente una dissociazione efficace del complesso anticorpo-C5 nei compartimenti endosomiali precoci

dopo la pinocitosi. Senza dissociazione, il complesso anticorpo:antigene viene riciclato al compartimento extracellulare attraverso il recettore Fc neonatale (FcRn) oppure individuato per degradazione liposomiale. In entrambi i casi l'anticorpo non è in grado di legarsi con più di due molecole di C5 durante la sua esistenza.

La forte affinità di eculizumab per C5 ($K_D \sim 30$ pM) consente un legame completo, puro di tutti i C5 nel sangue, garantendo che pochissimi C5 vengano attivati per formare C5a e TCC. L'affinità di eculizumab per C5 è quindi direttamente collegata all'efficacia in vivo dell'anticorpo in pazienti trattati con l'anticorpo. Gli inventori hanno voluto indebolire l'affinità di eculizumab per C5, senza compromettere l'efficacia di eculizumab in vivo. Sebbene la descrizione non sia limitata a tale approccio, questo è stato raggiunto introducendo istidina in una o più posizioni delle CDR di eculizumab. L'istidina ha un pKa di 6,04. Questo indica che quando i valori del pH scendono da 7,4 (sangue) a meno di 6,0 (endosomi precoci), le istidine ottengono un protone. Quindi, nell'endosoma, le istidine diventano caricate più positivamente. Gli inventori hanno ipotizzato che introducendo le istidine nel sito di legame, oppure

vicino al sito di legame per C5 in eculizumab, lo spostamento di carica nell'endosoma possa disgregare il legame nell'endosoma, mentre si mantiene un'elevata affinità per C5 a pH neutro nel sangue. Tali sostituzioni vengono ipotizzate per aumentare la semivita facilitando la dissociazione dell'anticorpo dal complesso anticorpo:C5 nell'ambiente acido dell'endosoma, consentendo all'anticorpo libero di venire riciclato mentre C5 viene degradato nel lisosoma.

Usando eculizumab come anticorpo parentale, è stata generata una serie di anticorpi variabili in cui ogni posizione delle CDR è stata sostituita con una istidina. La regione variabile della catena pesante di eculizumab ha la seguente sequenza di amminoacidi:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFSNYWIQWVRQAPGQGLEWMGEIL-
PGSGSTEYTENFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARYFFGSS-
PNWYFDVWGQGLVTVSS (SEQ ID n. 7). (Le regioni delle

CDR della regione variabile della catena pesante sono sottolineate). La regione variabile della catena leggera di eculizumab ha la seguente sequenza di amminoacidi:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNWYQQKPGKAPKLLIYGAT-
NLADGVPSRFSSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQNVLNTPLTFGQGTKV-
EIK (SEQ ID n. 8).

Il risultato di questo sforzo di acquisizione dell'istidina consiste in 66 varianti di eculizumab con singole sostituzioni dell'istidina. Le sequenze codificanti della catena leggera e della catena pesante per queste varianti di anticorpi sono state clonate in plasmidi separati di "singoli costrutti genici" adatti per espressione nelle cellule di mammiferi e nelle sequenze confermate. Gli anticorpi contenenti una singola sostituzione di amminoacidi sono stati espressi in modo temporaneo in cellule HEK293F mediante co-trasfezione di singoli costrutti genici che codificano per una singola catena leggera oppure catena pesante. È stata anche eseguita una co-trasfezione di catene pesanti e leggere di "tipo selvatico" che rappresentano le sequenze non modificate nelle CDR di eculizumab (EHL000). I supernatanti nella coltura tissutale sono stati normalizzati per il livello di espressione degli anticorpi ed utilizzati per valutare l'anticorpo che si lega a C5 umano rispetto a EHL000, usando interferometria a bio-strati su uno strumento Octet Red (ForteBio Inc.). In breve, gli anticorpi sono stati catturati su un biosensore di Fc IgG anti-umano (ForteBio, cat. n. 18-5001). Le punte caricate sono state quindi esposte ad una soluzione tamponata a pH 7,4 contenente 12,5 nM di C5

umano purificato naturale per 800 secondi, per valutare le cinetiche di associazione rispetto all'anticorpo parentale. Le cinetiche di dissociazione sono state valutate mediante trasferimento delle punte in una soluzione tamponata con pH di 7,4 o in una soluzione tamponata con pH di 6,0 per 800 secondi. Tutte le misurazioni sono state ripetute per garantire la coerenza delle letture.

Le varianti di eculizumab con le singole sostituzioni di istidina sono state scelte sulla base di una serie di tre proprietà rispetto a eculizumab. Le varianti di istidina preferite deviavano solo da K_a e K_d di eculizumab a pH 7,4 ad un grado minore, ma si scostavano da K_d di eculizumab a pH 6,0 in modo più significativo. I criteri di selezione delle rispettive soglie erano i seguenti:

(1) una variazione massima per le cinetiche di associazione a pH 7,4 di uno spostamento di fase del picco inferiore del 33% a 800 secondi in confronto allo spostamento di fase del picco medio a 800 secondi osservato per eculizumab;

(2) una variazione massima per le cinetiche di dissociazione a pH 7,4 non superiore ad una riduzione di 3 volte nello spostamento della fase del picco in 800 secondi in confronto allo spostamento di fase del

picco medio a 800 secondi osservato per eculizumab; e

(3) una variazione minima per le cinetiche di dissociazione a pH di 6,0 di una riduzione di almeno 3 volte nello spostamento della fase del picco in 800 secondi in confronto allo spostamento della fase del picco medio a 800 secondi osservato per eculizumab.

Per esempio, per quanto riguarda il punto (1) precedente, se lo spostamento della fase del picco medio dopo 800 secondi di associazione con eculizumab è approssimativamente di 0,75 mm, un anticorpo di prova che ha uno spostamento della fase inferiore a 0,5 mm (per esempio riprodotto due o più volte) non soddisferà i suddetti criteri. Al contrario, un anticorpo di prova con uno spostamento della fase di picco maggiore di 0,5 mm a 800 secondi soddisferà il primo criterio.

Le singole sostituzioni nella regione variabile della catene leggera che hanno soddisfatto queste soglie erano le seguenti: Y27H, I34H, L52H e S57H, tutte rispetto alla SEQ ID n. 7. Si vedano le figure 5A, 5B, 5C e 5D.

È stata generata una seconda serie di anticorpi contenente tutte le possibili combinazioni di due sostituzioni di istidina alle posizioni in cui le singole sostituzioni hanno soddisfatto i criteri di so-

glia. Si veda la tabella 1.

Queste cinetiche di associazione e dissociazione sono state analizzate mediante gli stessi metodi e confrontate sia con l'anticorpo parentale originario sia con le singole sostituzioni di istidina. Analogamente, sono state generate una terza ed una quarta serie di anticorpi contenenti, rispettivamente, tre o quattro sostituzioni di istidina, e sono state analizzate le cinetiche di associazione e dissociazione in confronto ai predecessori con due o tre sostituzioni di istidina importanti. Si veda la tabella 1. A ciascun stadio sono stati usati gli stessi criteri per le soglie minime per le cinetiche di associazione a pH 7,4, per le soglie massime per le cinetiche di dissociazione a pH 7,4 e per le soglie minime per le cinetiche di dissociazione a pH 6. Otto combinazioni di sostituzione hanno soddisfatto i suddetti criteri e sono state scelte per determinazione dell'affinità a pH 7,4 e pH 6,0 mediante SPR. Le affinità sono esposte nella tabella 4.

Tabella 4

<u>Nome del clone</u>	<u>Sequenza VL</u>	<u>Sequenza VH</u>	<u>KD pH 7.4 (nM)</u>	<u>KD pH 6.0 (nM)</u>	<u>rapporto di KD a pH 6.0/ pH 7.4</u>
eculizumab	SIN:8	SIN:7	0.033	0.685	21
EHL000	SIN:8	SIN:7	0.018	0.419	24
EHL001	G31H, rispetto a SIN:8.	SIN:7	0.330	1900	5758
EHL004	G31H, rispetto a SIN:8.	S57H	0.135	374	2770
EHL046	G31H, rispetto a SIN:8.	SIN:7, con Y27H, L52H	1.150	ND	NA
EHL049	G31H,	SIN:7,	0.573	ND	NA

<u>Nome del clone</u>	<u>Sequenza VL</u>	<u>Sequenza VH</u>	<u>KD pH 7.4 (nM)</u>	<u>KD pH 6.0 (nM)</u>	<u>rapporto di KD a pH 6.0/ pH 7.4</u>
	a SIN:8.	con Y27H, S57H			
EHL055	G31H, rispetto a SIN:8.	SIN:7, con I34H, S57H	0.623	2550	4093
EHG302	SIN:8	SIN:7, Y27H, L52H	0.289	10.0	35
EHG303	SIN:8	SIN:7, con Y27H, S57H	0.146	1190	8151
EHG305	SIN:8	SIN:7, con I34H, S57H	0.160	10.8	68

*SIN si riferisce a SEQ ID n.

Per queste combinazioni di sostituzioni, l'affinità di eculizumab per C5 è stata ridotta di più di 1000 volte a pH 6,0, mentre l'affinità ha subito una riduzione non superiore alle 20 volte a pH 7,0. Tra questi, è stato scelto EHG303 (tabella 4) per ulteriori analisi per la sua elevata affinità a pH 7,4

(0,146 nM) e per il rapporto (K_D a pH 6,0)/(K_D a pH 7,4) di oltre 8.000. Il polipeptide a catena pesante dell'anticorpo EHG303 comprende la seguente sequenza di aminoacidi:

MGWSCIIILFLVATATGVHSLEOVOLVOSGAEVKKPGASVKV SCKASGHIFSN-
YWIOWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGHTEYTENFKDRVTMTRDTSTSTVYMEL-
SSLRSEDTAVYYCARYFFGSSPNWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPPLAP-
CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL-
SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV ERKCCVECPPCPAPPVAGP-
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK-
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ-
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENYKTPP-
PVLDSDSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLKG

(SEQ ID n. 24). Il polipeptide a catena leggera dell'anticorpo EHG303 comprende la seguente sequenza di aminoacidi:

MGWSCIIILFLVATATGVHSRDIOMTOSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGA-
LNWYQQKPGKAPKLLIYGATNLDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA-
TYYCQNVLNTPLTFGQGTKVEIKRTRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC-
LLNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE-
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID n. 25). Nelle

suddette sequenze, le porzioni sottolineate corrispondono alla sequenza leader di ciascun polipeptide e le porzioni in corsivo sono aminoacidi eterologhi introdotti mediante clonazione.

È stato anche scelto l'anticorpo EHL049. Il suo polipeptide a catena pesante comprende la seguente sequenza di amminoacidi:

MGWSCIIILFLVATATGVHS*LEQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGHIFSN-*
YWIQWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGHTEYTENFKDRVTMTRDTSTSTVYMEL-
*SSLRSED*TAVYYCARYFFGSSPNWYFDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAP-
CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL-
SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAG-
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK-
TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA-
KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL-
SLSLGK (SEQ ID n. 26). Il polipeptide a catena leggera

dell'anticorpo EHL049 comprende la seguente sequenza di amminoacidi:

MGWSCIIILFLVATATGVHS*RDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYHA-*
LNWYQQKPKGKAPKLLIYGATNLDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA-
TYYCQNVLNTPLTFGQGTKVEIKRTRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC-
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADY-
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID n. 27). Nelle

suddette sequenze, le porzioni sottolineate corrispondono alla sequenza leader di ciascun polipeptide e le porzioni in corsivo sono amminoacidi eterologhi introdotti mediante clonazione.

Infine, il polipeptide a catena pesante EHL000

comprende la seguente sequenza di amminoacidi:

MGWSCIIILFLVATATGVHS*LEQVQLVQSGAEVKKPGASVKV*SCKASGYIFSN-
YWIQWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTEYTENFKDRVTMTRDTSTSTVYMEL-
SSLRSEDTAVYYCARYFFGSSPNWYFDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAP-
CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL-
SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPVAGP-
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK-
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ-
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT-
PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLKGK

(SEQ ID n. 28). Il polipeptide a catena leggera dell'anticorpo EHL000 comprende la seguente sequenza di amminoacidi:

MGWSCIIILFLVATATGVHS*RDIQMTQSPSSLSASV*GDRVTITCGASENIYGA-
LNWYQQKPKGKAPKLLIYGATNLADGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA-
TYYCQNVLNTPLTFGQGTKVEIKRTRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC-
LLNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYE-
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID n. 29). Nelle

suddette sequenze, le porzioni sottolineate corrispondono alla sequenza leader di ciascun polipeptide e le porzioni in corsivo sono amminoacidi eterologhi introdotti mediante clonazione.

Esempio 4. Le sostituzioni di istidina prolungano la semi-vita di eculizumab nel siero

Il polipeptide a catena leggera ed il polipepti-

de a catena pesante di ciascuno degli anticorpi di EHL e EHG precedenti, sono stati espressi da singoli costrutti genici. Le sequenze che codificano per le catene pesanti e leggere da EHG303 sono state combinate in un doppio vettore di espressione genica, poiché erano le sequenze della catena leggera e pesante per l'anticorpo EHL049. Il clone di EHG303 risultante è stato indicato come BNJ421 ed il clone di EHL049 risultante è stato indicato come BNJ423.

La sequenza di amminoacidi della regione variabile della catena pesante di BNJ421 è la seguente:

QVQLVQSGAEVKXPGASVKVSCKASGHIFSNYWIQWVRQAPGQGLEWMGEIL-
PGSGHTEYTENFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARYFFGSS-
PNWYFDVWGQGLVTVSS (SEQ ID n. 12). La sequenza di am-

minoacidi della regione variabile della catena leggera per BNJ421 è la seguente:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNWIYQKPGKAPKLLIYGAT-
NLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQNVLNTPLTFGQGTK-
VEIK (SEQ ID n. 8).

La regione variabile della catena pesante dell'anticorpo BNJ423 comprende la seguente sequenza di amminoacidi:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGHIFSNYWIQWVRQAPGQGLEWMGEIL-
PGSGHTEYTENFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARYFFGSS-
PNWYFDVWGQGLVTVSS (SEQ ID n. 12). La sequenza di am-

minoacidi della catena leggera per BNJ423 è la seguente:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCGASENIYHALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQNVLNTPLTFGQGT-KVEIK (SEQ ID NO: 18).

Queste due molecole sono state valutate insieme a EHL000 in topi che erano immunocarenti (NOD/scid) e carenti di C5. Una dose singola di 100 µg di EHL000, BNJ421 oppure BNJ423 in 200 µg di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) è stata somministrata mediante iniezione intravenosa (i.v.) a ciascuno degli otto topi. Il siero è stato prelevato da ciascuno dei topi i giorni uno, tre, sette, 14, 21, 28 e 35 dopo la somministrazione. La concentrazione di ciascun anticorpo nel siero è stata misurata mediante ELISA. La semi-vita nel siero dell'anticorpo è stata calcolata usando il software Pharsight Phoenix® WinNonlin® versione 6.3 usando l'analisi non compartimentale (NCA) e la risposta diretta Emax. La percentuale di anticorpi rimanenti nel siero è stata calcolata come segue:

$$\% \text{ di anticorpi rimanenti} = C_t / C_1 \times 100$$

in cui C_t = concentrazione di anticorpi in un dato giorno; e C_1 = concentrazione di anticorpi il giorno 1. I risultati sono rappresentati nella fig. 6

e nella tabella 5.

Tabella 5

<u>Ab testato</u>	<u>Siero T ½</u> (giorni)	<u>Errore</u> standard (SE)
EHL000	22.18	1.01
BNJ421	25.29	0.81
BNJ423	24.69	2.16

Per determinare l'effetto di C5 umano sulla semi-vita di questi anticorpi usando lo stesso modello di topo, ai topi è stato somministrato C5 umano simultaneamente ad una dose di carica di 250 µg il giorno -1 (il giorno prima della somministrazione degli anticorpi), seguito da dosi due volte al giorno di 50 µg di C5 per mantenere la concentrazione di C5 nel siero ad approssimativamente 20 µg/ml (come descritto nell'esempio 1).

Come mostrato nella fig. 7 (e nella tabella 6 seguente), la semi-vita di EHL000 (eculizumab-IgG1) nel modello di topo in presenza di (hC5) umano (ad una concentrazione che era maggiore del rapporto molare 1:1 di C5:eculizumab) era di $2,49 \pm 0,34$ giorni, mentre la semi-vita degli anticorpi BNJ421 e BNJ423 (contenenti le sostituzioni di istidina) era sostanzialmente maggiore di, rispettivamente, $15,25 \pm 0,90$ giorni e $22,71 \pm 0,71$ giorni. Questi risultati indi-

cano che le sostituzioni di istidina nelle CDR di eculizumab, e l'affinità dipendente dal pH risultante per C5, riducono significativamente la velocità di clearance delle varianti di eculizumab dal siero rispetto a eculizumab.

Tabella 6

<u>Ab testato</u>	<u>Siero T ½</u> <u>(giorni)</u>	<u>SE</u>
EHL000	22.18	1.01
BNJ421	25.29	0.81
BNJ423	24.69	2.16
EHL000+hC5	2.49	0.34
BNJ421+hC5	15.25*	0.90
BNJ423+hC5	22.71	1.19

*Significativo rispetto a EHL000 + hC5

Esempio 5. Le varianti di eculizumab con sostituzioni di istidina non perdono l'attività inibitoria del complemento

Inoltre, è stata anche valutata negli esperimenti descritti nell'esempio 4 l'attività emolitica nel siero di ciascuno dei campioni contenenti C5 umano. L'attività del complemento terminale nel siero dei topi è stata determinata valutando la sua capacità di lisare eritrociti di pollo. Poiché i topi usati erano

carenti di C5, l'attività emolitica riflette direttamente l'attività di C5 umano nel campione. In breve, gli anticorpi a 50, 3 e 0 µg/ml in una soluzione salina tamponata con gelatina-veronal (GVBS) (Comptech Catalog n. B100) contenente lo 0,1% di gelatina, NaCl 141 mM, MgCl₂ 0,5 mM, CaCl₂ 0,15 mM, barbital di sodio 1,8 mM, sono stati usati, rispettivamente, come controllo di lisi bassa, media e al 100%. I campioni sperimentali sono stati preparati mediante diluizione del siero di prova murino 1:10 in GVBS. Le aliquote di campioni (50 µl) sono state distribuite nei pozzetti corrispondenti in triplicato di una piastra a 96 pozzetti (Corning; Tewksbury, MA Catalog n. 3799) contenente un volume uguale di 20% di siero di topo carente di C5 e 20% di siero umano (Bioreclamation, n. di catalogo HMSRM-COMP+) in GVBS in pozzetti di controllo, ed un volume uguale di 20% di siero di topo carente di C5 e 20% di siero umano privo di C5 (Complement Technologies, numero del catalogo A320) in GVBS in pozzetti con i campioni di prova. EDTA (2 µl a 500 mM, Sigma, numero del catalogo E-9884) è stato aggiunto nel terzo pozzetto sia del controllo sia dei triplicati dei campioni per generare un controllo di colore del siero senza emolisi. Gli eritrociti di pollo sono stati lavati in GVBS, sensibiliz-

zati per attivare il percorso classico del complemento mediante incubazione con un anticorpo policlonale RBC anti-pollo (Intercell Technologies; 0,1% volume/volume) a 4°C per 15 minuti, nuovamente lavati e risospesi in GVBS ad una concentrazione finale di $\sim 7,5 \times 10^7$ cellule/ml. Gli eritrociti di pollo sensibilizzati ($\sim 2,5 \times 10^6$ cellule) sono stati aggiunti alla piastra contenente i controlli ed i campioni, miscelati brevemente su un agitatore per piastre ed incubati a 37°C per 30 min. I reagenti sono stati miscelati nuovamente, centrifugati a 845 x g per 3 minuti, e 85 μ l del supernatante sono stati trasferiti in pozzetti di una piastra di microtitolazione a fondo piatto a 96 pozzetti (Nunc, Penfield, NY, n. catalogo 439454). È stata misurata l'assorbanza a 415 nm usando un lettore di micropiastre ed è stata determinata la percentuale di emolisi usando la seguente formula:

$$\% \text{ di emolisi} = \frac{\text{OD del campione} - \text{OD di controllo del colore del campione}}{\text{OD del controllo con 100\% di lisi} - \text{OD del controllo del colore con 100\% di lisi}} \times 100$$

in cui OD = densità ottica.

Come mostrato nella fig. 8, nonostante la leggera riduzione dell'affinità a pH 7,4 rispetto a eculizumab, sia BNJ421 sia BNJ423 sono ancora in grado di legarsi a quasi tutto il C5 umano presente in circo-

lazione e di inibire l'emolisi. Questi risultati indicano che l'affinità di eculizumab per C5 può venire indebolita senza compromettere l'efficacia dell'anticorpo in vivo, e conferendo all'anticorpo un aumento della semi-vita nel siero.

Esempio 6. Il legame dipendente dal pH con C5 ed il miglioramento del riciclo mediato da FcRn sono additivi per la semi-vita nel siero delle varianti di eculizumab

Come mostrato in precedenza, in presenza di C5 umano, la semi-vita di una variante di eculizumab sostituita con istidina è stata significativamente estesa in topi transgenici. Per valutare gli effetti additivi potenziali del legame dipendente dal pH con C5 e con FcRn sulle farmacocinetiche (PK) e sulle farmacodinamiche (PD) degli anticorpi anti-C5 in presenza della sintesi costitutiva di C5 e di FcRn umano, è stata eseguita una serie di esperimenti per PK/PD usando anticorpi anti-C5 di topo con regioni costanti umane in topi transgenici che esprimono FcRn umano. Questi anticorpi anti-C5 murini sono stati manipolati dalla regione variabile di BB5.1, un anticorpo murino che agisce come surrogato farmacologico per eculizumab poiché si lega a C5 di topo e previene la sua scissione nei frammenti metabolici attivi C5a

e C5b [De Vries et al. (2003) Transplantation 3:375-382]. Un anticorpo anti-C5 di topo ad elevata affinità (indicato come: BHL011) è stato manipolato con una variante ottimizzata per affinità delle regioni variabili murine BB5.1 e delle regioni costanti di Igk umane e IgG2/G4 umane. Una variante dipendente dal pH di BHL011 è stata modificata mediante incorporazione di tre sostituzioni di istidina nelle regioni variabili murine (questa variante è stata indicata come BHL006). Un terzo anticorpo è stato modificato mediante incorporazione di due sostituzioni di amminoacidi nella catena pesante della regione costante umana (M428L, N434S) per aumentare l'affinità per hFcRn (questa variante è stata indicata come BHL009).

La sequenza di amminoacidi del polipeptide a catena leggera di BHL006 è la seguente:

NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPK-
LLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCAQHLSHRTF-
GGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFYPREAKVQWKVD-
NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSS-
PVTKSFNRGEC (SEQ ID n. 30). La sequenza di amminoacidi del polipeptide della catena pesante dell'anticorpo BHL006 è la seguente: QVQLQQPGAELVLRPGTSVKLSC-
KASGYTFTSSWMHWVKQRPGQGLEWIGVIDPHDSYTNYNQKFKGKATLTVDT-
SSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGGGSSYNRYFDVWGTGTTVTVSSASTKG-

PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL-
QSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCCVECPP-
CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDG-
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE-
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN-
GQPENYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT-
QKSLSLSLGK (SEQ ID n.31).

La sequenza di amminoacidi del polipeptide a catena leggera di BHL009 è la seguente:

NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKL-
LIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCAQHLSHRTFG-
GGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFYPREAKVQWKVDN-
ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP-
VTKSFNRGEC (SEQ ID n. 32).

La sequenza di amminoacidi del polipeptide a catena pesante di BHL009 è la seguente:

QVQLQQPGAELVLRPGTSVKLSCKASGYTFTSSWMHWVKQRPGQGLEWIGVID-
PHDSYTNYNQKFKGKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGGGSSY-
NRYFDVWGTGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE-
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDP-
KPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV-
TCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD-
WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV-
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW-
QEGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID n. 33).

La sequenza di amminoacidi del polipeptide a catena leggera of BHL011 è la seguente:

NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCAQYLSSRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID n. 34).

La sequenza di amminoacidi del polipeptide a catena pesante di BHL011 è la seguente:

QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSSWMHWVKQRPGQGLEWIGVIDPDSYTNYNQKFKGKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGGGSSYNRYFDVWGTGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID n. 35).

Le cinetiche del legame di BHL011, BHL006 e BHL009 con il topo purificato sono state determinate mediante SPR su uno strumento BIACore 3000 usando un metodo di cattura umano anti-Fc. In breve, Fc anti-umano (KPL, numero di catalogo: 01-10-20) diluito a 0,1 mg/ml in acetato di sodio 10 mM a pH 5,0, è stato immobilizzato su due celle a flusso di un chip di CM5

per 8 minuti mediante accoppiamento con ammine. Gli anticorpi sono stati diluiti a 0,25 µg/ml in un tampone di prova (HBS-EP; Hepes 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,005% volume/volume di tensioattivo P20; GE Life Sciences, numero di catalogo: BR1001-88). L'anticorpo diluito è stato quindi iniettato su una cella a flusso seguita da un'iniezione di C5 di topo 6 nM su entrambe le celle. La seconda cella a flusso è stata usata come superficie di riferimento. Il legame è stato valutato a pH 7,4 e a pH 6,0. La superficie è stata rigenerata ciascuna volta con HCl 20 mM, 0,01% di P20. I dati sono stati trattati con un modello di Langmuir 1:1 usando il software BIAevaluation 4.1 con doppio riferimento. La dissociazione di BHL011, BHL006 e BHL009 complessati con C5 di topo a pH 6,0 è stata valutata in modo simile, con un'iniezione di C5 di topo 6 nM (pH 7,4) seguita da un'iniezione di tampone HBS-EP (pH 6,0). I risultati di questi esperimenti sono mostrati nella tabella 7.

Tabella 7

Ab	Velocità di associazione K_a (1/M*s)		Velocità di dissociazione K_d (1/s)		Costante di dissociazione K_p (nM)		Chi ²		% Diss. in 300 s	
	pH 7.4	pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0
BHL011	6.44 $\times 10^5$	2.39 $\times 10^3$	6.13 $\times 10^{-5}$	1.28 $\times 10^{-4}$	0.0952	53.6	0.0194	0.048	1	7
BHL006	2.93 $\times 10^5$	NB	1.02 $\times 10^{-3}$	NB	3.49	NB	0.021	NB	28	100
BHL009	2.61 $\times 10^5$	NB	1.09 $\times 10^{-3}$	NB	4.19	NB	0.0234	NB	28	100

*"NB" non è stato osservato alcun legame specifico;
 "Ab" si riferisce al nome dell'anticorpo

Per determinare gli effetti del legame dipendente dal pH con C5 sulle farmacocinetiche (PK) di un anticorpo anti-C5 in presenza di sintesi di C5 costitutivo ed il potenziale di miglioramento del riciclo di FcRn per conferire aumenti aggiuntivi della semi-vita, è stata analizzata la concentrazione totale nel siero di BHL011, BHL006 e BHL009 usando il modello di topo transgenico con FcRn descritto nell'esempio 1. La concentrazione totale di anticorpo nel siero e la concentrazione nel siero come percentuale della concentrazione del giorno 1 sono mostrate nelle figure 9-11. I topi maschi sono rappresentati con linee continue e quelli femmina con linee tratteggiate. Le concentrazioni totali di anticorpi nel siero il giorno 1 erano maggiori per le femmine rispetto ai maschi, proporzionali alle differenze nella massa cor-

porea e nel volume della distribuzione. Questa differenza nel genere ha contribuito alla variabilità tra gli animali per le farmacocinetiche di BHL011, verosimilmente dovuta alla non linearità dipendente dalla dose che deriva dalla clearance mediata da C5 (figure 9A e 9B). Generalmente la variabilità tra gli animali era bassa per BHL006 (figure 10A e 10B) e BHL009 (figure 11A e 11B) ad eccezione di una femmina nel gruppo di dose di BHL006 (2939) che ha mostrato una clearance accelerata. Le ragioni della clearance accelerata nell'animale 2939 sono sconosciute.

In presenza della sintesi costitutiva di C5 e di hFcRn, l'anticorpo anti-C5 IgG2/4 ad elevata affinità (BHL011) aveva una semi-vita terminale media di 6 giorni e veniva eliminato dalla circolazione per circa il 98% a 21 giorni (figure 12 e 13; tabella 8). La velocità media di clearance per un anticorpo anti-C5 dipendente dal pH con una regione di Fc IgG2/4 (BHL006) è stata diminuita, con una semi-vita media di fase beta di 16-19 giorni. Un altro aumento di circa 2 volte nella semi-vita è stato osservato per un anticorpo anti-C5 dipendente dal pH con una regione di Fc IgG2/4 con migliorata affinità per hFcRn (semi-vita di BHL009 circa 36 giorni). Questi parametri sono coerenti con quelli osservati per gli anti-

corpi anti IgG2/4 con e senza sostituzioni di M428L, N434S in assenza dell'antigene in topi con hFcRn. Questi risultati dimostrano che il legame con C5 dipende dal pH e l'affinità aumentata per FcRn conferiscono altri effetti per estendere l'esposizione delle PK degli anticorpi anti-C5.

Tabella 8

Anticorpo	Nome dell'animale	Genere	Peso corporeo (g)	C _{MAX} (µg/mL)	Semi-vita (giorni)
BHL011	2929	M	37.8	519.8	7.2
	2930	M	33.5	512.2	7.1
	2963	F	23.2	805.0	6.2
	2964	F	20.2	814.6	5.0
	2965	F	23.4	823.5	4.4
BHL006	2905	M	37.5	361.6	15.4
	2906	M	36.1	378.8	19.1
	2939	F	21.8	836.0	4.6
	2940	F	23.9	635.3	21.6
	2941	F	20.0	906.9	20.1
BHL009	2913	M	31.2	402.6	45.8
	2914	M	31.0	606.7	45.0
	2947	F	21.3	724.9	33.2
	2948	F	22.3	590.1	22.8
	2949	F	20.9	652.8	33.1

Farmacodinamiche di anticorpi anti-C5 di topo in topi

transgenici con FcRn umano

L'attività farmacologica degli anticorpi anti-C5 di topo nei campioni di siero è stata valutata ex vivo in un saggio di emolisi con eritrociti di pollo mediata dal percorso classico del complemento (globuli rossi di pollo; cRBC). L'attività emolitica è stata calcolata come percentuale dell'attività in campioni pre-dose e viene mostrata nelle figure 14-16. I maschi sono rappresentati con linee continue e le femmine con linee tratteggiate. L'antagonismo dell'attività emolitica ex vivo è proporzionale alla concentrazione di anticorpo totale nel campione. La differenza di genere nella durata dell'antagonismo dell'attività emolitica era pronunciata per BHL011 (fig. 14) che corrispondeva alla variabilità tra gli animali dipendente dalla massa corporea per le PK di BHL011 (fig. 9). Generalmente la variabilità tra gli animali era bassa per BHL006 (fig. 15) e BHL009 (fig. 16) ad eccezione della femmina nel gruppo con dose di BHL006 (2939) che ha mostrato una clearance degli anticorpi accelerata (fig. 10).

Le differenze nella correlazione tra la concentrazione totale di anticorpi nel siero e l'antagonismo dell'attività emolitica ex vivo sono proporzionali all'affinità dell'anticorpo per C5. L'an-

ticorpo ad elevata affinità (BHL011) ha eliminato quasi completamente l'attività emolitica a circa 200 µg/ml (fig. 17) mentre gli anticorpi anti-C5 dipendenti dal pH ad affinità più debole richiedono concentrazioni maggiori da 2 a 3 volte per ottenere un antagonismo pieno ex vivo (figure 18 e 19).

Nonostante questa perdita di potenza negli anticorpi anti-C5 dipendenti dal pH, i livelli medi di attività per emolisi di cRBC negli animali di ciascun gruppo suggeriscono che essi possono sopportare un intervallo di somministrazione esteso. Il giorno 14 gli animali trattati con anti-C5 ad elevata affinità (BHL011) avevano livelli di attività emolitica medi > del 40%, mentre gli animali trattati con anti-C5 dipendente dal pH (BHL006 e BHL009) hanno mantenuto livelli medi di attività emolitica < del 40% fino a, rispettivamente, il giorno 21 e 28 (fig. 20).

L'estensione significativa della semi-vita e la durata corrispondente dell'antagonismo degli anticorpi con legame dipendente dal pH con C5 di topo (BHL006 e BHL009) rispetto all'anticorpo anti-C5 di topo ad elevata affinità (BHL011) era coerente con gli studi descritti negli esempi 4 e 7 in cui l'anticorpo anti-C5 umano dipendente dal pH (BNJ421, BNJ423 oppure BNJ441) ha presentato una semi-vita con

aumento simile rispetto alla sua controparte ad elevata affinità (EHL000 oppure eculizumab) in topi cui è stato co-somministrato C5 umano. Queste scoperte confermano ulteriormente il concetto secondo cui la modifica del legame dell'antigene dipendente dal pH mediante selezione di sostituzioni di istidina nelle CDR può diminuire significativamente la clearance mediata dall'antigene nonostante C5, consentendo all'anticorpo libero di venire nuovamente riutilizzato nella circolazione. Inoltre, la combinazione del legame dell'antigene dipendente dal pH e dell'affinità migliorata per FcRn in BHL009 era aggiuntiva per gli effetti sulle proprietà delle PK, raddoppiando la semi-vita rispetto al legame da solo dipendente dal pH (BHL006). Queste osservazioni sono coerenti con l'ipotesi che il legame dipendente dal pH con C5 in combinazione con l'affinità migliorata per FcRn possa fornire un'estensione significativa nei parametri delle PK e nella durata delle PD terapeutiche osservate per eculizumab, consentendo \geq somministrazioni mensile.

Esempio 7. Generazione di una variante di eculizumab con legame con C5 dipendente dal pH e con miglioramento del riciclo mediato da FcRn

Un anticorpo è stato generato usando eculizumab

come molecola parentale. Rispetto a eculizumab, l'anticorpo variante (indicato BNJ441) conteneva quattro sostituzioni di amminoacidi nella catena pesante, Tyr-27-His, Ser-57-His, Met-429-Leu e Asn-435-Ser (si noti che le posizioni 429 e 435 di BNJ441 corrispondono alle posizioni 428 e 434 con il sistema di numerazione UE). La sequenza di amminoacidi per il polipeptide a catena pesante viene rappresentata in SEQ ID n. 14. La sequenza di amminoacidi per il polipeptide a catena leggera viene rappresentata in SEQ ID n. 11. Queste mutazioni sono state modificate per consentire un intervallo tra le somministrazioni esteso con BNJ441 (cfr. eculizumab) mediante aumento della semi-vita circolante attraverso due meccanismi distinti: (1) riduzione della clearance degli anticorpi attraverso clearance degli anticorpi mediata dal bersaglio e (2) aumento dell'efficacia del riciclo degli anticorpi mediato da FcRn.

Le due sostituzioni di amminoacidi nelle prime e nelle seconde regioni determinanti la complementarità (CDR) della regione variabile della catena pesante, Tyr-27-His e Ser-57-His, indeboliscono la costante di dissociazione per affinità (K_D) di BNJ441 per C5 di circa 17 volte a pH 7,4 e di circa 36 volte a pH 6,0 in confronto a eculizumab. Le due mutazioni

nel terzo dominio della regione costante della catena pesante (CH3), Met-429-Leu e Asn-435-Ser, aumentano l'affinità di BNJ441 per FcRn di circa 10 volte a pH 6,0 in confronto a eculizumab.

Cinetiche di legame (Anticorpo con C5)

Le cinetiche del legame di BNJ441 o di eculizumab con C5 sono state determinate mediante risonanza plasmonica di superficie (SPR) su uno strumento BIAcore 3000 usando un metodo di cattura anti-Fc a pH 8,0, 7,4, 7,0, 6,5 e 6,0. Un anticorpo policlonale anti-IgG umane di capra (Fc) (KPL n. 01-10-20) è stato diluito a 0,1 mg/ml in acetato di sodio 10 mM a pH 5,0 ed immobilizzato su due celle a flusso di un chip CM5 per 8 min mediante accoppiamento con ammine. L'anticorpo di prova (BNJ441 o eculizumab) è stato diluito a 0,20 µg/ml in un tampone di prova (HBS-EP; HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,005% volume/volume di tensioattivo P20; GE Life Sciences, numero di catalogo: BR1001-88). L'anticorpo diluito è stato quindi iniettato su una cella a flusso (20 µl per un esperimento a pH 7,4 e 40 µl per un esperimento a pH 6,0) seguito da iniezioni di varie concentrazioni di C5 in entrambe le celle. Il tampone di prova è stato titolato con HCl 3 M per cinetiche a pH 7,0, 6,5 e 6,0 e con NaOH 0,5 M per le cinetiche con pH

8,0. La superficie è stata rigenerata per ciascun ciclo con HCl 20 mM, 0,01% di P20. I dati sono stati trattati con un modello di Langmuir 1:1 usando il software BIAevaluation 4.1 (BIAcore AB, Uppsala, Sweden) con doppio riferimento.

Le velocità di dissociazione di C5 da BNJ441 o eculizumab a pH 8,0, 7,4, 7,0, 6,5 e 6,0 sono state determinate mediante SPR su uno strumento BIAcore 3000 usando il metodo di cattura anti-Fc descritto in precedenza con le seguenti modifiche. Gli anticorpi di prova diluiti sono stati iniettati in una cella a flusso seguiti da un'iniezione di C5 6 nM in entrambe le celle. Subito dopo l'iniezione di C5, sono stati iniettati 250 µl di tampone di prova a vari pH. I tamponi di prova sono stati preparati come descritto in precedenza. I dati sono stati trattati usando il software BIAevaluation 4.1 (BIAcore AB, Uppsala, Sweden) con doppio riferimento. La % di dissociazione di C5 da BNJ441 e eculizumab è stata calcolata considerando la differenza nella dissociazione a $t = 0$ e $t = 300$ secondi.

Cinetiche di legame (anticorpi con FcRn)

Le cinetiche del legame di BNJ441 o di eculizumab con FcRn umano sono state determinate attraverso SPR su uno strumento BIAcore 3000 usando un metodo di

cattura di Fab')₂ a pH 7,4 e 6,0. F(ab')₂ di IgG anti-umane di F(ab')₂ di capra (Rockland Immunochemicals, numero di catalogo: 709-1118) diluito a 0,04 mg/ml in acetato di sodio 10 mM a pH 5,0, è stato immobilizzato su due celle a flusso di un chip di CM5 per 7 minuti mediante accoppiamento con ammine. L'anticorpo di prova (BNJ441 oppure eculizumab) è stato diluito a 2 µg/ml in un tampone di prova ((HBS-EP; HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,005% volume/volume di tensioattivo P20; GE Life Sciences, Cat.n. BR1001-88). L'anticorpo diluito è stato quindi iniettato in una cella a flusso seguita da iniezioni di FcRn in entrambe le cellule. Il tampone di prova è stato quindi triturato con HCl 3 M per cinetiche con pH 6,0. La superficie è stata rigenerata ad ogni ciclo con glicina-HCl 10 mM, pH 1,5). I dati sono stati trattati con un modello di Langmuir 1:1 usando il software di BIAvalutazione (BIAcore AB, Uppsala, Sweden) con doppio riferimento.

Risultati degli studi di legame

È stato trovato che le cinetiche del legame anticorpo:C5 sono dipendenti dal pH con effetti sulla velocità sia di associazione sia di dissociazione e sono mostrate nella tabella 9.

Tabella 9

BNJ441				
pH	Velocità di associazione K_a (1/M*s)	Velocità di dissociazione K_d (1/s)	Costante di dissociazione K_D (M)	Chi²
8.0	$6.25 * 10^5$	$1.33 * 10^{-4}$	$2.13 * 10^{-10}$	0.055
7.4	$4.62 * 10^5$	$2.27 * 10^{-4}$	$4.91 * 10^{-10}$	0.045
7.0	$4.28 * 10^5$	$3.90 * 10^{-4}$	$9.11 * 10^{-10}$	0.028
6.5	$4.08 * 10^5$	$8.94 * 10^{-4}$	$2.19 * 10^{-9}$	0.172
6.0	$1.63 * 10^5$	$3.54 * 10^{-3}$	$2.18 * 10^{-8}$	0.373
Eculizumab				
pH	Velocità di associazione K_a (1/M*s)	Velocità di dissociazione K_d (1/s)	Costante di dissociazione K_D (M)	Chi²
8.0	$1.39 * 10^6$	$2.04 * 10^{-5}$	$1.47 * 10^{-11}$	0.104
7.4	$1.10 * 10^6$	$3.23 * 10^{-5}$	$2.93 * 10^{-11}$	0.094
7.0	$8.86 * 10^5$	$6.34 * 10^{-5}$	$7.15 * 10^{-11}$	0.032
6.5	$8.41 * 10^5$	$1.73 * 10^{-4}$	$2.06 * 10^{-10}$	0.037
6.0	$7.05 * 10^5$	$4.28 * 10^{-4}$	$6.06 * 10^{-10}$	0.092

In un tentativo di modellare le rispettive velocità di dissociazione dei complessi anticorpo:C5 dopo pinocitosi ed acidificazione dell'endosoma precoce, si è lasciato che si formassero complessi di anticorpo:C5 in un tampone con pH 7,4, quindi le condizioni del pH del tampone sono state cambiate durante la dissociazione. È stata calcolata la percentuale di dissociazione degli anticorpi dal complesso (stimata

dalla diminuzione delle unità di risonanza [RU]) dopo 300 secondi per ciascuna condizione di pH (tabella 10). Solo BNJ441 a pH 6,0 ha avuto come risultato una dissociazione del complesso anticorpi:C5 maggiore del 50% dopo 5 minuti.

Tabella 10

BNJ441			
pH	RU 0 s	RU 300 s	% di dissociazione
8.0	55.4	53.5	3.4
7.4	55.7	52.0	6.6
7.0	55.2	49.1	11.0
6.5	55.2	39.4	28.6
6.0	55.8	22.3	60.0
Eculizumab			
pH	RU 0 s	RU 300 s	% di dissociazione
8.0	70.2	69.7	0.8
7.4	70.0	69.5	0.7
7.0	71.3	69.9	2.0
6.5	71.2	67.8	4.7
6.0	71.6	62.9	12.2

Le figure 21A e 21B rappresentano diagrammi semi-log e lineari della percentuale di dissociazione dei complessi di BNJ441:C5 oppure dei complessi eculizumab:C5 in funzione del pH.

Le due sostituzioni di amminoacidi nelle prime e nelle seconde regioni determinanti la complementarie-

tà (CDR) della regione variabile della catena pesante, Tyr-27-His e Ser-57-His, indeboliscono la costante di dissociazione per affinità (K_D) di BNJ441 per C5 di circa 17 volte a pH 7,4 e di circa 36 volte a pH 6,0 in confronto a eculizumab. Non è chiaro se la dipendenza dal pH dell'affinità di BNJ441 per C5 sia il risultato di cambiamenti nello stato di protonazione delle istidine introdotte alle posizioni 27 e/oppure 57, oppure semplicemente un indebolimento generale dell'affinità per C5. Tuttavia, è stato osservato in altri anticorpi anti-C5, che queste mutazioni in combinazione con altre sostituzioni di istidina, hanno avuto come risultato perdite molto più pronunciate di affinità a livelli di pH inferiori a 6,5. Le due mutazioni nel dominio della regione costante della catena pesante (CH3), Met-429-Leu e Asn-435-Ser, rafforzano l'affinità di BNJ441 per FcRn di circa 10 volte a pH 6,0 in confronto a eculizumab.

Proprietà delle PK dell'anticorpo BNJ441

L'anticorpo BNJ441 ed eculizumab sono stati valutati in topi che erano immunocarenti (NOD/scid) e carenti di C5. Una dose singola di 100 µg di BNJ441 o di eculizumab in 200 µl di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) è stata somministrata mediante iniezione intravenosa (i.v.) in ciascuno degli otto

topi. Il siero è stato raccolto da ciascuno dei topi nei giorni uno, tre, sette, 14, 21, 28 e 35 dopo la somministrazione. La concentrazione di ciascuno anticorpo nel siero è stata misurata mediante ELISA.

Come mostrato nella fig. 22, in assenza di C5 umano, le concentrazioni di anticorpi nel siero sono diminuite in modo analogo in topi cui erano stati somministrati BNJ e eculizumab in un periodo di 35 giorni. Tuttavia, in presenza di C5 umano, le concentrazioni di eculizumab nel siero sono diminuite rapidamente a livelli non rilevabili dopo il giorno 14, mentre la concentrazione di BNJ441 nel siero è diminuita più lentamente e ad una velocità costante per tutta la durata dello studio (fig. 23).

Confrontando i profili delle PK dei due anticorpi in presenza ed in assenza di C5 umano, la clearance di eculizumab è accelerata in presenza di C5 umano in confronto a quella in assenza di C5 umano, mentre il profilo delle PK di BNJ441 in presenza di C5 umano era simile a quello di BNJ441 in assenza di C5 umano fino al giorno 28, e la clearance è accelerata solo tra il giorno 28 ed il giorno 35 (fig. 24). La semi-vita di BNJ441 e la semi-vita di eculizumab erano confrontabili in assenza di C5 umano ($25,37 \pm 1,02$ giorni per BNJ441 e $27,65 \pm 2,28$ giorni per eculizu-

mab). Tuttavia, in presenza di C5 umano, BNJ441 ha dimostrato un aumento della semi-vita superiore alle 3 volte in confronto a eculizumab ($13,40 \pm 2,18$ giorni per BNJ441 rispetto a $3,93 \pm 0,54$ giorni per eculizumab). Si deve notare che la velocità di clearance di BNJ441 non ha differito in modo significativo in presenza o in assenza di C5 umano fino al giorno 28. Si veda la tabella 11.

Tabella 11

Gruppo di trattamento	N. dell'animale	Semi-vita (giorni)
BNJ441	2009	26.99
	2011	25.55
	2212	24.5
	2213	20.34
	2214	27.18
	2215	24.35
	2216	28.65
		Media = 25.37
		SE = 1.02
Eculizumab	2201	30.65
	2202	16.85
	2203	27.02
	2204	28.54
	2205	19.7
	2206	35.47
	2207	33.77
	2208	29.18
		Media = 27.65
		SE = 2.28
BNJ441+ C5 umano	2225	24.31
	2226	13.45
	2227	N/A
	2228	13.48
	2229	16.09
	2230	8.55
	2231	11.25
	2232	6.66
		Media = 13.40
		SE = 2.18
Eculizumab + C5 umano	2217	3.35
	2218	2.72
	2219	7.45
	2220	3.26

Gruppo di trattamento	N. dell'animale	Semi-vita (giorni)
	2221	2.74
	2222	3.93
	2223	4.5
	2224	3.51
		Media = 3.93
		SE = 0.54

Attività emolitica nel siero

Per determinare l'effetto delle sostituzioni di istidina sull'attività emolitica dell'anticorpo, è stato eseguito un saggio emolitico ex vivo come descritto nell'esempio 6. In presenza di BNJ441 oppure eculizumab, l'attività del complemento terminale era coerente con i rispettivi profili delle PK di ciascun anticorpo (fig. 25), vale a dire che il livello di inibizione dell'attività emolitica nel siero era proporzionale alla concentrazione di ciascun anticorpo rimanente nel siero. Entrambi gli anticorpi hanno conferito un'inibizione dell'emolisi quasi totale fino al giorno 3. Tuttavia, eculizumab non ha mostrato alcun antagonismo fino al giorno 14, mentre BNJ441 ha mantenuto un'inibizione all'83% fino al giorno 14 ed un'inibizione del complemento parziale fino al giorno 28.

Conclusione

Le scoperte di questo studio suggeriscono che in presenza di C5 umano, BNJ441 mostra un'estensione

della semi-vita superiore alle tre volte in confronto a eculizumab. Inoltre, la semi-vita nel siero di BNJ441 rispetto a eculizumab è traslata in un profilo farmacodinamico esteso, come evidenziato dall'inibizione emolitica prolungata.

Esempio 8. Sicurezza, tollerabilità, PK e PD di BNJ441 in soggetti umani sani

La sicurezza, la tollerabilità, le PK e le PD di BNJ441 sono state valutate in uno studio clinico sull'uomo, randomizzato, cieco, con dose singola crescente (SAD) e con controllo con placebo, in cui BNJ441 è stato somministrato per via intravenosa a soggetti sani.

BNJ441 è stato formulato in una soluzione acquosa sterile, priva di conservanti con eccipienti di formulazione. La formulazione di BNJ441 non conteneva alcun eccipiente insolito, oppure eccipienti di origine animale o umana. La formulazione è stata tamponata con fosfato ad un pH di 7,0. I componenti comprendevano 10 mg/ml di BNJ441, fosfato sodico monobasico 3,34 mM, fosfato sodico dibasico 6,63 mM, cloruro di sodio 150 mM, 0,02% di polisorbato 80 ed acqua in quantità sufficiente.

La formulazione di BNJ441 è stata alimentata come soluzione di anticorpo di 10 mg/ml in una provetta

ad uso singolo di 20 ml, ed è stata prevista per infusione mediante diluizione della stessa in una soluzione salina disponibile in commercio (iniezione in cloruro di sodio allo 0,9%, Ph. Eur.) per somministrazione IV.

Tabella 12. Prova clinica di fase 1 in volontari sani

N. di protocollo	Titolo	Progetto dello studio	Popolazione	Regime di dosaggio
BNJ441-HV-101	Fase 1, studio randomizzato cieco, a dose singola crescente, con controllo con placebo per valutare la sicurezza, la tollerabilità le PK e le PD di BNJ441 come dose singola somministrata per via IV a soggetti sani	Primo studio sull'uomo, randomizzato, a doppio cieco con controllo con placebo, a dose singola crescente	Volontari sani	Gruppo 1: 200 mg di BNJ441 (4 attivi, 2 placebo) Gruppo 2: 400 mg di BNJ441 (6 attivi, 2 placebo)

Dieci soggetti sani hanno ricevuto una dose singola di BNJ441. Quattro soggetti hanno ricevuto una dose di 200 mg e sei soggetti hanno ricevuto una dose di 400 mg. I dati delle PK e della sicurezza per questo studio sono stati determinati e descritti in quanto segue.

Farmacocinetiche

I profili di concentrazione-tempo di BNJ441 nel siero dopo somministrazione IV di dosi di 200 mg e di 400 mg sono rappresentati nella figura 26. I dati della concentrazione-tempo sono disponibili fino al giorno 90 (2.136 ore) e al giorno 57 (1.344 ore) dopo le dosi di, rispettivamente, 200 mg e 400 mg.

Un riassunto dei parametri delle PK di BNJ441 è

riportato nella tabella 12 seguente. La C_{max} media geometrica (CV) di BNJ441 era di 78,5 (10,2%) $\mu\text{g/ml}$ dopo una dose di 200 mg, e di 139 (16,2%) $\mu\text{g/ml}$ dopo una dose di 400 mg. t_{max} mediano osservato (campo) era di 2,4 (da 0,79 a 8,0) ore per la dose di 200 mg, e di 0,58 (da 0,58 a 1,1) ore per la dose di 400 mg dopo l'inizio dell'infusione. L' $AUC_{(0-56 \text{ giorni})}$ media geometrica (CV) è di 32.800 (8,6%) $\mu\text{g-h/ml}$ per la dose di 200 mg, e 58.100 (18,9%) $\mu\text{g-h/ml}$ per la dose di 400 mg. La C_{max} media geometrica e la $AUC_{(0-56 \text{ giorni})}$ media geometrica indicano che l'esposizione è aumentata in modo proporzionale alla dose evidente. $t_{1/2}$ medio geometrico (CV) è di 38,5 (18,4%) giorni, e di 32,9 (13,3%) giorni per le dosi rispettivamente di 200 mg e 400 mg.

Riassumendo, i dati sulle PK suggeriscono che la C_{max} e l' $AUC_{(0-56 \text{ giorni})}$ medie di BNJ441 sono aumentate in modo proporzionale alla dose e mantengono un $t_{1/2}$ medio di $35,5 \pm 6,1$ giorni (scostamento standard [SD]) dopo somministrazione IV. L'analisi dei dati dell'emolisi dei globuli rossi di pollo (cRBC) indica che il complemento terminale era stato completamente inibito per un periodo fino a 2 giorni dopo una singola dose per via IV di 400 mg, quando le concentrazioni di BNJ441 erano maggiori di 100 $\mu\text{g/ml}$.

Tabella 12. Riassunto dei parametri delle farmacocinetiche per BNJ441 in seguito a somministrazione IV di 200 mg oppure di 400 mg a volontari sani

Dose (mg)	Statistica descrittiva	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	C_{max}/Dose ($\mu\text{g/mL/mg}$)	t_{max} (h)	AUC_{τ}^* ($\text{h}\mu\text{g/mL}$)	AUC_{τ}/Dose ($(\text{h}\mu\text{g/mL})/\text{mg}$)	$t_{1/2}$ (giorno)
200	N	4	4	4	4	4	4
	Media geometrica	78.5	0.392	2.40 ^b	32,800	164	38.5
	CV% Media geometrica	10.2	10.2	0.79 – 8.0 ^c	8.6	8.6	18.4
400	N	6	6	6	6	6	6
	Media geometrica	139	0.348	0.58 ^b	58,100	145	32.9
	CV% Media geometrica	16.2	16.2	0.58 – 1.1 ^c	18.9	18.9	13.3

* $AUC_{\tau} = AUC_{(0-56 \text{ giorni})}$

^bmediano

^ccampo

Farmacodinamiche

È stata anche valutata la capacità di BNJ441 di inibire l'emolisi di cRBC nel tempo, come mostrato nella figura 27. L'attività media dell'emolisi di cRBC era relativamente stabile nei soggetti che hanno ricevuto il placebo. L'inizio dell'inibizione dell'emolisi di cRBC è stato rapido, e l'inibizione completa del complemento terminale è stata osservata al termine dell'infusione (0,29 ore per la dose di 200 mg e 0,58 ore per la dose di 400 mg). BNJ441 aveva una durata di azione dipendente dalla dose, che è durata per un periodo da 4 a 14 giorni.

La relazione tra la concentrazione di BNJ441 e

l'emolisi di cRBC è stata tracciata ed è rappresentata nella figura 28. Come mostrato nella figura 28, l'inibizione completa del complemento del terminale si è verificata a concentrazioni di BNJ441 superiori a 50 µg/ml, mentre non è stata osservata alcuna inibizione a concentrazioni di BNJ441 inferiori a 25 µg/ml.

Esempio 9. Studio sulla dose singola in scimmie cinomolgo

Una dose singola IV di BNJ441 è stata somministrata a scimmie cinomolgo con dosi di 60 oppure 150 mg/kg (n = 4 per ciascun gruppo di dosaggio; 2 maschi e 2 femmine per gruppo di dosaggio) come infusione di 2 ore. I campioni di sangue per l'analisi di BNJ441 sono stati prelevati dal giorno 1 al giorno 112.

Tutte le scimmie trattate con BNJ441 sono state valutate per la presenza di anticorpi di cinomolgo anti-umani (CAHA) prima della somministrazione (ora 0) e i giorni 8, 14, 28, 56, 84 e 112.

Tutte le scimmie del gruppo con dose di 60 mg/kg e del gruppo con dose di 150 mg/kg sono state confermate come positive in almeno una singola occasione, tranne che l'animale 2002 nel gruppo con dose di 150 mg/kg. La presenza di CAHA nell'animale 2002, oppure in punti di tempo non positivi per gli altri animali,

non può venire esclusa, a causa di una possibile interferenza di BNJ441 somministrato con il saggio sulla formazione di ponti di BNJ441 biotinilato e BNJ441 rutenilato. I risultati positivi a CAHA sono stati osservati nel gruppo con dose di 60 mg/kg dal giorno 56 al 112 dopo la somministrazione, e nel gruppo con dose di 150 mg/kg dal giorno 28 al 112 dopo la somministrazione. Il primo campione positivo a CAHA confermato nel gruppo con dose di 60 mg/kg era nel giorno 56 (animali 1002 e 1503), due nel giorno 84 (animali 1002 e 1503) e tre nel giorno 112 (animali 1001, 1002 e 1502). L'animale 1503, che era positivo a CAHA il giorno 56 ed il giorno 84, non era più positivo a CAHA il giorno 112. Il primo campione positivo a CAHA confermato nel gruppo con dose di 150 mg/kg era l'animale 2502 il giorno 28, seguito da 2 scimmie il giorno 56 (animali 2001 e 2502), tre scimmie il giorno 84 (animali 2001, 2501 e 2502) e tre scimmie il giorno 112 (animali 2001, 2501 e 2502).

Sono stati calcolati i singoli profili di concentrazione-tempo di BNJ441. Nel gruppo con dose di 60 mg/kg, tutte le scimmie avevano concentrazioni di BNJ441 nel plasma quantificabili fino al giorno 112 del campione per le PK, mentre nel gruppo con dose di 150 mg/kg, solo 1 scimmia (animale 2002) aveva con-

centrazioni di BNJ441 nel plasma quantificabili fino al giorno 112. I dati di concentrazione-tempo hanno indicato una permanenza prolungata di BNJ441 nella circolazione sistemica delle scimmie.

I parametri non compartamentali delle PK e le statistiche riassuntive per BNJ441 sono stati calcolati per tutte le scimmie mediante il livello della dose, e sono mostrati nelle tabelle 13 e 14 rispettivamente per i livelli di dose di 60 mg/kg e di 150 mg/kg. Coerente con la durata dell'infusione, t_{max} mediano era di 2 ore per i livelli di dose di 60 mg/kg e 150 mg/kg. Una scimmia nel gruppo con dose di 150 mg/kg, l'animale 2501, aveva un t_{max} di 12 ore dopo la somministrazione, ed aveva un profilo relativamente piatto da 2 a 12 ore dopo la somministrazione, con la concentrazione del campione 12 ore dopo la somministrazione approssimativamente maggiore del 5% rispetto a quella osservata 2 ore dopo la somministrazione. C_{max} media geometrica AUC_{∞} e AUC_{finale} sono tutti aumentati con l'aumento della dose. I valori della C_{max} media geometrica normalizzati con la dose erano simili nelle 2 dosi, il che indica un aumento proporzionale alla dose della concentrazione del picco di BNJ441 con un aumento della dose, ma i valori di AUC_{∞} media geometrica normalizzati con la dose erano diversi tra

i gruppi di dosi. Questa differenza è verosimilmente dovuta ad un aumento mediato da CAHA della CL di BNJ441 nel gruppo con dose di 150 mg/kg; la clearance di BNJ441 era approssimativamente maggiore del 37% in scimmie cui sono stati somministrati 150 mg/kg in confronto alle scimmie cui sono stati somministrati 60 mg/kg. V_{ss} medio geometrico era simile (entro il 12%) tra i gruppi con le due dosi.

Tabella 13. Riassunto dei parametri farmacocinetici non compartamentali di BNJ441 (dose di 60 mg/kg)

Animale	Dose (mg/kg)	C_{max} (mg/mL)	$C_{max}/Dose^1$	t_{max} (hr)	AUC (hr × mg/mL)	AUC_{∞} (hr × mg/mL)	$AUC_{\infty}/Dose^2$	V_{ss} (mL/kg)	CL (mL/h/kg)	$t_{1/2}$ (hr)	$t_{1/2}$ (giorno)
1001	60	1.92	0.0320	2.0	546	555	9.25	63.4	0.108	479	20.0
1002	60	1.90	0.0317	2.0	470	475	7.92	55.3	0.126	474	19.8
1502	60	1.45	0.0242	2.0	598	614	10.2	64.9	0.0977	547	22.8
1503	60	1.44	0.0240	2.0	701	745	12.4	73.7	0.0806	649	27.1
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Media	1.68	0.0280	2.00	579	597	9.95	64.3	0.103	537	22.4
	SD	0.269	0.00448	NA	97.0	113	1.89	7.53	0.0191	81.7	3.40
	Min	1.44	0.0240	2.00	470	475	7.92	55.3	0.0806	474	19.8
	Mediano	1.68	0.0279	2.00	572	585	9.74	64.2	0.103	513	21.4
	Max	1.92	0.0320	2.00	701	745	12.4	73.7	0.126	649	27.1
	CV%	16.0	16.0	NA	16.8	19.0	19.0	11.7	18.5	15.2	15.2
	Media geometrica	1.66	0.0277	NA	573	589	9.82	64.0	0.102	533	22.2
	CV% Media geometrica	16.2	16.2	NA	16.9	19.0	19.0	11.8	19.0	14.8	14.8

¹⁾ Le unità sono mg/ml/mg/kg

²⁾ Le unità sono h × mg/ml/mg/kg

Hr = ora; NA = non applicabile

Tabella 14. Riassunto dei parametri farmacocinetici non compartamentali di BNJ441 (dose di 150 mg/kg)

Animale	Dose (mg/kg)	C _{max} (mg/mL)	C _{max} /Dose ¹⁾	t _{max} (hr)	AUC _{last} (hr × mg/mL)	AUC _∞ (hr × mg/mL)	AUC _∞ /Dose ²⁾	V _{ss} (mL/kg)	CL (mL/h/kg)	t _{1/2} (hr)	t _{1/2} (giorno)
2001	150	3.79	0.0253	2.0	787	787	5.25	52.6	0.191	61.0	2.54
2002	150	4.51	0.0301	2.0	1160	1220	8.15	89.8	0.123	759	31.6
2501	150	4.48	0.0299	12.0	1460	1460	9.71	58.8	0.103	87.6	3.65
2502	150	4.40	0.0293	2.0	1030	1030	6.86	37.5	0.146	54.1	2.25
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Media	4.30	0.0286	4.50	1110	1120	7.49	59.7	0.141	240	10.0
	SD	0.340	0.00227	NA	279	285	1.90	22.0	0.0377	346	14.4
	Min	3.79	0.0253	2.00	787	787	5.25	37.5	0.103	54.1	2.25
	Mediano	4.44	0.0296	2.00	1100	1130	7.50	55.7	0.134	74.3	3.09
	Max	4.51	0.0301	12.0	1460	1460	9.71	89.8	0.191	759	31.6
	CV%	7.91	7.91	NA	25.2	25.3	25.3	36.9	26.8	144	144
	Media geometrica	4.28	0.0286	NA	1080	1100	7.30	56.8	0.137	122	5.07
	CV% Media geometrica	8.25	8.25	NA	26.1	26.7	26.7	37.2	26.7	190	190

¹⁾Le unità sono mg/ml/mg/kg

²⁾Le unità sono h x mg/ml/mg/kg

Hr = ora; NA = non applicabile

Esempio 10. Una valutazione comparativa del legame di BNJ441, eculizumab e h5G1.1 con i recettori di Fc-gamma C1q in vitro

È stato esaminato il legame di tre anticorpi umanizzati, BNJ441, eculizumab e h5G1.1-IgG1 con molecole note per essere mediatori della funzione effettrice degli anticorpi. BNJ441, eculizumab e h5G1.1-IgG1 presentano ciascuno profili funzionali e terapeutici unici. Tuttavia, tutti e tre sono antagonisti di anticorpi umanizzati del complemento terminale, che si legano ad un epitopo molto simile sul componente C5 del complemento umano e prevengono la sua scissione durante l'attivazione del complemento

nei suoi metaboliti attivi, C5a e C5b

BNJ441, eculizumab e h5G1.1-IgG1 sono identici nelle loro sequenze della catena leggera, ciascuno avendo una regione variabile umanizzata ed una regione costante di Igkappa umano. BNJ441 e eculizumab contengono entrambi un IgG2-G4 Fc ibrido, umano, che comprende la regione CH1, gli amminoacidi di cerniera ed i primi 29 amminoacidi della regione CH2 delle IgG2 umane condensate con il rimanente delle regioni CH2 e CH3 delle IgG4 umane. Questo Fc chimerico combina l'accoppiamento mediante legame disolfuro stabile di una IgG2 con le proprietà effettrici minime di una IgG4. Poiché BNJ441 ed eculizumab vengono indirizzati contro un antigene solubile, non è possibile valutare direttamente la loro capacità di innescare la citotossicità mediata dalla cellula dipendente dall'anticorpo (ADCC) oppure la citotossicità dipendente dal complemento (CDC). Invece, sono state eseguite misurazioni dirette del legame di BNJ441 o di eculizumab con i recettori di Fcgamma (FCγR) e con il componente C1q del complemento, ed è stato dedotto che in assenza del legame essi non possono mediare, rispettivamente, ADCC oppure CDC. h5G1.1-IgG1 (un anticorpo isotopo IgG1 con la stessa regione variabile umanizzata di eculizumab) è stato compreso come con-

trollo. Si prevede che la regione Fc con isotopo IgG1 si leghi completamente con molecole con funzione effettrice, sebbene h5G1.1-IgG1 stesso non stimoli ADCC o CDC in assenza di un antigene associato alle cellule.

Come descritto in precedenza nell'esempio 7, BNJ441 è stato modificato rispetto a eculizumab per aumentare la sua semi-vita in vivo introducendo 4 sostituzioni di amminoacidi nella catena pesante. Due cambiamenti di amminoacidi nella regione variabile della catena pesante umanizzata, rispettivamente Tyr-27-His e Ser-57-His (numerazione degli amminoacidi della catena pesante secondo Kabat et al.), sono stati introdotti per destabilizzare il legame con C5 a pH 6,0 con influenza minima sul legame con C5 a pH 7,4. Sono state introdotte mutazioni nel terzo dominio della regione costante della catena pesante (CH3), Met-428-Leu e Asn-434-Ser, per migliorare il legame con il recettore Fc neonatale umano (FcRn). Prese insieme, queste mutazioni sono state progettate per diminuire significativamente la clearance del farmaco mediata dall'antigene aumentando la dissociazione dei complessi anticorpi:C5 per liberare gli anticorpi nell'ambiente acido dell'endosoma precoce dopo la pinocitosi, e per aumentare la frazione di an-

ticorpi riciclati dall'endosoma precoce nuovamente nel compartimento vascolare mediante FcRn.

In questi studi, le interazioni multimeriche delle sotto-categorie di FcγR (FcγR1, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIb/c, FcγRIIIa e FcγRIIIb) con tutti e tre gli anticorpi sono state valutate in un saggio immunoassorbente legato all'enzima (ELISA), e le interazioni monomeriche con FcγR sono state valutate usando la risonanza plasmonica di superficie (SPR). L'interferometria a doppio strato e SPR sono state usate per esaminare il legame di Clq con i tre anticorpi. I reagenti usati per eseguire queste analisi sono mostrati nella tabella 15.

Tabella 15. Anticorpi e reagenti di proteine

Reagente	Fonte	Concentrazione
BNJ441	Alexion	10 mg/mL
Eculizumab	Alexion	10 mg/mL
F(ab') ₂ -biotina anti-umana di capra	Jackson Immunolabs	1.1 mg/mL
HRP-streptavidina	Invitrogen	1.25 mg/mL
h5G1.1-IgG1	Alexion	1.43 mg/mL 8.11 mg/mL
C1q	Complement Technology	1 mg/mL
FcγRI umano (CD64)	R&D systems	100 µg/mL
FcγRIIa umano (CD32a)	R&D systems	100 µg/mL
Human FcγRIIb/c (CD32b/c)	R&D systems	100 µg/mL
FcγRIIIa umano (CD16a)	R&D systems	100 µg/mL
FcγRIIIb umano (CD16b)	R&D systems	100 µg/mL

Legame di complessi di anticorpi multivalenti con FcγR

I complessi di anticorpi sono stati preparati mediante incubazione di BNJ441, eculizumab oppure h5G1.1-hG1 per una notte con F(ab')₂-biotina anti-umana di capra (Jackson Immunolabs), in un rapporto

molare anticorpo:F(ab')₂ di 2:1 in una soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) in una provetta Microfuge[®] di 1,5 ml.

Piastre di microtitolazione pre-rivestite con Ni-NTA (Qiagen) sono state incubate con 50 µl/pozzetto di 6 X FcγR umano marcato con istidina (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb/c, FcγRIIIa oppure FcγRIIIb), ad una concentrazione del recettore di 5 µg/ml in PBS, per una notte a 4°C. La piastra è stata quindi lavata 3 volte con PBS/0,05% di Tween-20. Dopo il lavaggio, 50 µl di complessi di anticorpi in PBS/0,05% di Tween-20 sono stati incubati nella piastra per 60 min a temperatura ambiente (RT). Dopo il lavaggio della piastra con PBS/0,05% di Tween-20, 50 µl di streptavidina-HRP (Invitrogen) in PBS/0,05% di Tween-20 sono stati aggiunti alla piastra ed incubati per 60 min a temperatura ambiente (RT). Dopo questa incubazione e questi lavaggi, sono stati aggiunti 75 µl di substrato per TMB-ELISA (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina, Thermo Scientific). La reazione è stata interrotta con 75 µl di H₂SO₄ 2 M, e l'assorbanza è stata letta a 450 nm.

I campioni sono stati testati in duplicato ed i dati sono stati presentati come valori medi. I risultati sono stati inseriti in un programma di foglio elettronico. L'assorbanza a 450 nm di ciascuna con-

centrazione di complesso immunologico di anticorpi oppure in assenza dei complessi immunologici di anticorpi è stata tracciata come rappresentazione grafica. Le costanti di dissociazione primarie sono state calcolate e vengono riassunte nella tabella 16 e descritte in quanto segue.

Legame di anticorpi monovalenti con FcγR

Le cinetiche del legame di BNJ441, eculizumab e h5G1.1-hG1 con FcγR sono state determinate attraverso SPR su uno strumento BIAcore 3000 usando l'immobilizzazione diretta. BNJ441, eculizumab e h5G1.1-hG1 sono stati diluiti in acetato di sodio 10 mM a pH 5,0, sono stati immobilizzati su una cella a flusso di un chip di CM5 mediante accoppiamento con ammine. Una seconda cella a flusso è stata usata come superficie di riferimento. Le concentrazioni di FcγR diluito in un tampone di prova (HBS-EP, pH 7,4) sono state iniettate su entrambe le celle. La superficie è stata rigenerata in ciascun ciclo con HCl 20 mM, 0,01% di P20. I dati sono stati analizzati usando un modello di affinità in uno stato costante con il software BIAevaluation 4.1 (BIAcore AB, Uppsala, Svezia) con doppio riferimento.

Le cinetiche del legame di h5G1.1-1gG1 con FcγR1 sono state valutate attraverso le singole cinetiche

del ciclo per la loro affinità più forte. L'anticorpo è stato diluito in acetato di sodio 10 mM a pH 5,0 ed immobilizzato direttamente su una cella a flusso di un chip CM5 mediante accoppiamento con ammine. Una seconda cella a flusso è stata usata come superficie di riferimento. Le concentrazioni di Fc γ R1 diluito in un tampone di prova (HBS-EP, pH 7,4) sono state iniettate su entrambe le celle. Questo saggio non richiedeva rigenerazione. I dati sono stati analizzati usando un modello 1:1 di cinetiche di titolazione con il software BIAevaluation 4.1 (BIAcore AB, Uppsala, Svezia) con doppio riferimento.

Tabella 16. Costanti di dissociazioni per il legame di BNJ441, eculizumab e h5G1.1-1gG1 con Fc γ R monomerici

FcγR	BNJ441, K_d [μM]	Eculizumab, K_d [μM]	h5G1.1-IgG1, K_d [μM]
RI	3.75	3.78	0.123
RIIa	2.31	2.58	0.8
RIIb/c	8.09	9.84	3.06
RIIIa	7.23	6.78	0.85
RIIIb	3.33	3.49	1.89

Sono stati eseguiti saggi ELISA per rilevare le interazioni multimeriche azionate dall'avidità di complessi immunologici di anticorpi con Fc γ R. I risultati vengono riassunti nella tabella 16. BNJ441 e

eculizumab non hanno mostrato alcun legame rilevabile con FcγRI, FcγRIIb/c, FcγRIIIa oppure FcγRIIIb ed un'associazione più debole rispettivamente da 4 a 8 volte con FcγRIIa. Le costanti di dissociazione (K_D) per legame monomero di FcγR con BNJ441 and eculizumab derivato da SPR hanno confermato che le interazioni con FcγR sono molto deboli e quasi indistinguibili tra i due anticorpi: FcγR1 (~ 4 μM), FcγRIIa (~ 2 μM), FcγRIIb (~ 9 μM), FcγRIIIa (~ 7 μM) e FcγRIIIb (~ 3 μM). Le costanti di dissociazione per il controllo con isotopo IgG1 (h5G1.1-1gG1) erano coerenti con le interazioni ad elevata affinità con FcγR1 (123 pM) e con un modesto aumento nel legame con FcγR a bassa affinità rispetto agli anticorpi dell'isotopo IgG2-G4: FcγRIIa (~ 1 μM), FcγRIIb (~ 3 μM), FcγRIIIa (~ 1 μM) e FcγRIIIb (~ 2 μM). Si veda la tabella 16. Nessuna interazione tra C1q e BNJ441 o eculizumab era rilevabile mediante interferometria a bio-strato. Questi risultati sono coerenti con l'idea che Fc delle IgG2-G4 umane chimeriche di eculizumab abbia poca o nessuna capacità di stimolare la funzione effettrice attraverso FcγR oppure C1q per mediare rispettivamente ADCC o CDC. Inoltre, questi risultati mostrano che le sostituzioni di amminoacidi della catena pesante incorporate in BNJ441 non modificano in modo signifi-

cativo il legame con glistessi, rispetto a eculizumab.

Esempio 11. Studi sulla reattività crociata sui tessuti

1. Studi sulla reattività crociata umana GLP

La reattività crociata potenziale con tessuti umani è stata determinata usando BNJ441 fluoresceinato (indicato con BNJ441-FITC) ed un anticorpo di controllo (OX-90G2G4-FITC) con una specificità antigenica differente.

BNJ441-FITC ha prodotto una colorazione del materiale di controllo positivo da moderata ad intensa (vetrini con macchie di resina-C5 ultravioletto [UV], proteina del complemento umano purificata, indicato hC5) ma non ha reagito in modo specifico con il materiale di controllo negativo (vetrini con macchie di UV-resina, ipercalcemia umana di peptide maligno, residui di amminoacidi 1-34 indicati PTHrP1-34). L'articolo di controllo, OX-90G2G4-FITC, non ha reagito in modo specifico con i materiali di controllo positivi o negativi. Le eccellenti reazioni specifiche di BNJ441-FITC con il materiale di controllo positive e la mancanza di reattività specifica con il materiale di controllo negativo, come pure la mancanza di reattività dell'articolo di controllo hanno indicato che

il saggio era sensibile, specifico e riproducibile. È stata osservata la colorazione con BNJ441-FITC nel gruppo di tessuto umano, come riassunto in quanto segue:

- Materiale proteico nella maggior parte dei tessuti umani

- Citoplasma e/oppure granuli citoplasmatici nei seguenti elementi tissutali:

- cellule mononucleari nel colon, esofago, linfonodi, paratiroidi, milza e tonsille

- piastrine in strisci di sangue e nel midollo osseo

- megacariociti nel midollo osseo

- epitelio nelle tube di Falloppio, nel fegato (epatociti), nei condotti pancreatici e nella cervice

- mesotelio nei polmoni.

Poiché C5 è una proteina circolante nel siero, è stata prevista colorazione del materiale proteico. È stato riportato che le cellule mononucleari, come monociti, macrofagi e cellule dendritiche, come pure le piastrine, secernono C5; quindi, è stata anche prevista la colorazione di questi tipi di cellule con BNJ441-FITC. Inoltre, le linee cellulari mesoteliali hanno mostrato di produrre C5. Tuttavia, non è disponibile alcuna letteratura che descriva l'espressione

di C5 da parte di tipi di cellule epiteliali colorate con BNJ441-FITC nell'attuale studio, oppure di megacariociti, sebbene le piastrine, che è stato mostrato che producono C5, vengano derivate dai megacariociti. Quindi, la colorazione di cellule di tipo epiteliale può rappresentare siti in precedenza non riconosciuti di espressione di C5, oppure reattività crociata dei tessuti con una sequenza o struttura di proteine da una proteina simile ma non correlata o da un altro costituente (costituenti) delle sezioni tissutali. Tuttavia, ad eccezione della colorazione di materiale proteinaceo, tutte le colorazioni osservate in questo studio erano di natura citoplasmatica, ed è improbabile che il citoplasma e le strutture citoplasmatiche siano accessibili all'articolo di prova in vivo. Riassumendo, non è stata osservata alcuna reattività crociata specifica di BNJ441-FITC che porterebbe a prevedere una tossicità correlata al trattamento.

1. Studi sulla reattività crociata di tessuti GLP in scimmie cinomolgo

Uno studio standard sulla reattività crociata in tessuti GLP è stato anche effettuato usando un gruppo di tessuti di scimmie cinomolgo per esaminare sia il legame bersaglio sia il legame non desiderato, con gli stessi reagenti usati negli studi di legame di

tessuti umani.

Sono state osservate alcune colorazioni con BNJ441-FITC nel gruppo di tessuti di scimmie cinomolgo, come riassunto in quanto segue.

- Materiale proteinaceo nella maggior parte dei tessuti di scimmie cinomolgo

- Citoplasma e/oppure granuli citoplasmatici nei seguenti elementi tissutali:

- cellule mononucleari nei linfonodi, nella milza e nelle tonsille

- epitelio nelle tube di Falloppio.

Il modello di colorazione di BNJ441-FITC osservato nel gruppo di tessuti di scimmie cinomolgo era in generale meno intenso e meno frequente di quello osservato nel gruppo di tessuti umani nello studio integrativo sulla reattività crociata in tessuti umani. Inoltre, nel gruppo di tessuti umani è stata osservata colorazione di piastrine, megacariociti, epitelio duttale pancreatico, epitelio della cervice, epatociti e mesotelio, sebbene questi elementi tissutali non siano stati colorati nel gruppo di tessuti di scimmie cinomolgo. Inoltre, ad eccezione della colorazione del materiale proteinaceo, la colorazione osservata in questo studio era di natura citoplasmatica, ed è improbabile che il citoplasma e le strut-

ture citoplasmatiche siano accessibili all'articolo di prova in vivo. Poiché è stato mostrato che BNJ441 sia squisitamente specifico per C5 umano (e non presenta reattività crociata con C5 di primati non umani), è probabile che il legame limitato osservato in questo studio sia dovuto al legame non specifico con un materiale con reattività crociata non identificato.

Esempio 12. Efficacia di BNJ441 in confronto a eculizumab in saggi sull'attività del complemento terminale

Le mutazioni modificate in BNJ441 che portano al legame dipendente dal pH con C5 indeboliscono la sua affinità a pH 7,4 (approssimativamente 491 pM) di circa 17 volte rispetto a eculizumab (approssimativamente 29,3 pM) e si può prevedere che riducano l'efficacia di inibizione da parte di BNJ441 dell'attività del complemento terminale mediata da C5 in confronto a eculizumab. Per valutare la potenza di BNJ441 e di eculizumab in condizioni fisiologicamente rilevanti, è stato saggiato l'antagonismo dell'emolisi mediata dal complemento di globuli rossi (RBC) di 3 modelli di animali comunemente usati (pollo, pecora e coniglio) nel 90% di siero umano normale.

RBC ed i globuli rossi di pecora (sRBC) sono

stati pre-sensibilizzati con anticorpi per iniziare l'attivazione del percorso classico del complemento (CCP). I globuli rossi di coniglio (rRBC) non sono stati pre-sensibilizzati e sono stati usati per l'attivazione del percorso alternativo del complemento (CAP). Gli anticorpi sono stati pre-incubati nel siero a 100, 200 e 400 nM, ottenendo rapporti molari tra siti di legame e C5 di approssimativamente, rispettivamente, 0,5:1, 1:1 e 2:1. L'anticorpo BNJ430 contiene la stessa regione di Fc di BNJ441, ma non si lega a C5 umano, ed è stato compreso come controllo negativo. È stata misurata la percentuale di emolisi a 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 minuti per garantire che le reazioni venissero osservate in condizioni di velocità iniziale.

Come mostrato nella figura 29, né BNJ441 né eculizumab hanno mostrato antagonismo a 100 nM nell'emolisi di rRBC. Entrambi gli anticorpi hanno presentato un antagonismo parziale a 200 nM (approssimativamente un rapporto molare 1:1 tra siti leganti l'antigene e C5), con BNJ441 avendo un'efficacia ridotta rispetto a eculizumab. L'inibizione dell'emolisi era quasi completa per l'uno o l'altro degli anticorpi quando incubati ad un rapporto molare di 2:1 tra i siti leganti l'antigene e C5 (400 nM). I risul-

tati dei saggi di emolisi di sRBC erano simili, mostrando meno del 20% di emolisi in presenza di BNJ441 a 200 nM, e quasi un'inibizione completa con ciascun anticorpo a 400 nM (dati non mostrati). I saggi sull'emolisi di rRBC mediata da CAP presentano livelli maggiori di emolisi in presenza di anticorpi anti-C5, senza alcuna inibizione rilevabile a 200 nM, ed un'inibizione solo parziale a 400 nM (dati non mostrati).

In conclusione, la perdita modesta di potenza di BNJ441 rispetto a eculizumab in questi saggi sull'attività del complemento in vitro è coerente con la sua affinità più debole per C5. L'affinità di BNJ441 per C5 è ancora approssimativamente inferiore di 1.000 volte rispetto alle concentrazioni di C5 in vivo ed ai livelli terapeutici desiderati di BNJ441, ed è quindi improbabile compromettere la sua efficacia terapeutica.

Esempio 13. Selettività di BNJ441 in confronto a eculizumab in saggi sull'attività del complemento terminale

Per valutare l'attività farmacologica di BNJ441 in modelli di animali non umani, sono state misurate le capacità di BNJ441 di essere antagonista dell'emolisi mediata dal complemento di cRBC sensibilizzati

dall'anticorpo nel siero di scimpanzé, babbuini, macachi reso, macachi cinomolgo, cani beagle, conigli, porcellini d'India, ratti e topi. Eculizumab ed un anticorpo anti-C5 di topo con un Fc delle IgG2/G4 (BNJ430) sono stati usati come controlli con isotopi.

cRBC sensibilizzati sono stati preparati per ciascun saggio da 400 µl di sangue intero di pollo in Alsever (Lampire Biologicals) e lavati 4 volte con 1 ml di GVBS a 4°C e risospesi in GVBS a 5×10^7 cellule/ml. Per sensibilizzare gli eritrociti di pollo, è stato aggiunto alle cellule un anticorpo policlonale anti-RBC di pollo (Rockland), a 150 µg/ml ed incubato per 15 min su ghiaccio. Dopo lavaggio con GVBS una volta, le cellule sono state risospese in GVBS fino ad un volume finale di 3,6 ml.

I sieri conservati per il complemento sono stati ottenuti dalla Bioreclamation comprendendo siero dei seguenti mammiferi: mammiferi: uomo; scimpanzé; babbuino; macaco reso; macaco cinomolgo; cane beagle; coniglio; porcellino d'India; e ratto. Gli anticorpi BNJ441 a 10 mg/ml; eculizumab (10 mg/ml); BNJ430 a 0,873 mg/ml sono stati diluiti fino ad una concentrazione finale di 0, 60, 300 e 600 nM in siero al 30% in GVBS ed incubati a temperatura ambiente per 30 min. cRBC sensibilizzati sono stati aggiunti alla mi-

scela di anticorpo/siero a 30 μ l per pozzetto per ($2,5 \times 10^6$ cellule), incubati a 37°C per 30 min e le reazioni sono state interrotte mediante aggiunta di 30 μ l di EDTA 0,5 M a ciascun pozzetto. Le piastre sono state centrifugate a 1800 X g per 3 min e 80 μ l del supernatante sono stati trasferiti in una nuova piastra a 96 pozzetti con fondo piatto. L'assorbanza è stata misurata a 415 nm. Poiché il siero di topo è una fonte scarsa di attività del complemento del percorso classico, il siero di topo è stato miscelato 1:1 con siero umano privo di C5, per valutare l'attività farmacologica potenziale di BNJ441 nei topi. Gli anticorpi sono stati diluiti fino ad una concentrazione finale di 0, 60, 300 e 600 nM nel 50% di siero totale (25% di siero di topo, 25% di siero umano privo di C5) in GVBS ed incubati a temperatura ambiente per 30 min. cRBC sensibilizzati sono stati aggiunti alla miscela di anticorpo/siero a 30 μ l per pozzetto ($2,5 \times 10^6$ cellule), incubati a 37°C per 30 min e le reazioni sono state interrotte mediante aggiunta di 30 μ l di EDTA 0,5 M a ciascun pozzetto. Le piastre sono state centrifugate a 1800 x g per 3 min e 80 μ l del supernatante sono stati trasferiti in una nuova piastra a 96 pozzetti con fondo piatto. L'assorbanza è stata misurata a 415 nm.

Sono stati usati campioni contenenti il siero senza gli anticorpi anti-C5 con o senza EDTA 10 mM, e, rispettivamente, controlli senza lisi o con lisi completa. Le condizioni dei campioni sono state eseguite in triplicato o duplicato.

I risultati sono stati inseriti in un foglio elettronico per consentire la sottrazione di fondo dei controlli senza lisi e la normalizzazione della percentuale di emolisi rispetto ai controlli con lisi completa, il calcolo dei valori medi (\pm SD) e la rappresentazione grafica dei dati. I valori dell'assorbanza per la base media dei controlli senza lisi sono stati sottratti da ciascun replicato e l'assorbanza dei campioni è stata espressa come percentuale di lisi nei controlli con lisi completa secondo la seguente equazione: % di emolisi di cRBC è uguale a (valore medio di A415 nel controllo con lisi completa - il valore medio di A415 nel controllo senza lisi) x 100.

Lo scostamento medio e standard della % di emolisi di cRBC per i replicati dei campioni sono stati tracciati come rappresentazione grafica (dati non mostrati).

È stato mostrato che BNJ441 presenta un legame rilevabile con C5 nativo in macachi cinomolgo e non ha alcuna attività farmacologica in vitro in qualsia-

si siero non umano testato ad un eccesso molare di 8 volte tra i siti leganti l'antigene e C5. Presi insieme, i dati sono coerenti con la conclusione che BNJ441 non ha alcuna attività farmacologica rilevante in qualsiasi specie non umana accessibile adatta per modellare le farmacocinetiche e le farmacodinamiche nell'uomo.

Esempio 14. Caratterizzazione chimico-fisica di BNJ441

L'anticorpo BNJ441 è un anticorpo ricombinante, umanizzato ed è costituito da due catene pesanti di 448 amminoacidi identici e da due catene leggere di 214 amminoacidi identici. Si veda la figura 30. Le regioni costanti di BNJ441 comprendono la regione costante della catena leggera kappa umana e la regione costante della catena pesante di IgG2-IgG4 umana ibrida (anche indicata come "G2/G4"). La regione costante di IgG2/G4 è stata razionalmente prevista per ridurre l'attivazione della funzione effettrice, l'attivazione del complemento e l'immunogenicità dell'anticorpo. Il dominio CH1 della catena pesante, la regione cerniera ed i primi 5 amminoacidi del dominio di CH2 corrispondono alle sequenze di amminoacidi di IgG2 umane, residui da 6 a 36 nella regione di CH2 e sono comuni sia alla sequenza di amminoacidi di IgG2

umana sia di IgG4 umana, mentre il rimanente del dominio di CH2 e del dominio di CH3 corrisponde alla sequenza di amminoacidi di IgG4. Le regioni variabili della catena pesante e della catena leggera che formano il sito di legame con C5 umano costituito da regioni strutturali umane sono state innestate in regioni determinanti la complementarietà murine. I legami disolfuro inter-catene nell'anticorpo BNJ441 sono rappresentati nella figura 31. I numeri di residui sono mostrati nella figura 31 per tutti gli accoppiamenti di legami disolfuro e i siti di glicani N-legati.

La tabella 17 elenca le proprietà generali dell'anticorpo BNJ441. La formula chimica teorica ed il peso molecolare medio teorico del componente principale presentati in quanto segue ipotizzano che l'anticorpo contenga diciotto legami disolfuro, due piroglutammazioni del terminale N della catena pesante, l'eliminazione di due lisine del terminale C della catena pesante e l'aggiunta di due residui di glicani G0F. Il numero di residui di amminoacidi in BNJ441 è stato previsto mediante analisi degli amminoacidi.

Tabella 17. Proprietà generali dell'anticorpo BNJ441

Proprietà	Valore
Formula chimica teorica	$C_{6542} H_{10072} N_{1704} O_{2106} S_{48}$
Peso molecolare medio teorico	147,827.62 Da
Numero di amminoacidi	1324

Una linea cellulare stabile di ovaie di criceto cinese (CHO) che esprime BNJ441 è stata sviluppata per la produzione di BNJ441. Le cellule ottenute dalla fonte CHOKISV usate per generare questa linea cellulare sono state ottenute dalla banca cellulare principale Lonza Biologies CHOK1SV 269M. È stato verificato che questa fonte di cellule fosse priva di contaminanti batterici e fungini e di tutti i virus rilevabili diversi dalle particelle cellulari retrovirali endogene che non sono infettivi. Le cellule di CHOK1SV ospiti sono state trasfettate con il plasmide pBNJ441.1 e sono stati scelti cloni stabili con MSX. Il clone principale 3A5 è stato scelto come linea cellulare di produzione per la produzione di BNJ441.

Sono state preparate cariche modificanti e cariche di GMP per cariche di sostanze farmaceutiche in blocco di BNJ441 e caratterizzate dal punto di vista chimico-fisico mediante le prove elencate nella tabella 18. La carica modificante è stata prodotta in un impianto pilota usando cellule di CHO coltivate in un bioreattore da 200 l ed il materiale purificato è

stato usato nello studio delle PK. La carica di GMP è stata prodotta usando cellule di CHO coltivate nell'impianto pilota usando un bioreattore da 200 l. Le cariche modificanti e le cariche di GMP con sostanze farmaceutiche in blocco per BNK441 sono state formulate e testate approssimativamente in 10 mg/ml. Le proprietà chimico-fisiche delle cariche sono riassunte nella tabella 19.

Tabella 18. Caratterizzazione chimico-fisica di BNJ441

Categoria di prova	Prova
Purezza	Ultracentrifugazione analitica
Dimensione	Analisi del peso molecolare intatto (MALDI-ToF-MS)
Dimensione	Analisi del peso molecolare intatto (ESI-ToF-MS)
Identità	Sequenziamento di N-terminale
Struttura primaria	Analisi degli amminoacidi
Struttura di ordine superiore	Spettrometria a dicroismo circolare
Modello di glicosilazione	Profilazione di massa di oligosaccaridi legati a N (MALDI-ToF-MS)
Modello di glicosilazione	Oligosaccaridi
Modello di glicosilazione	Monosaccaridi
Modello di glicosilazione	Acido sialico
Termostabilità	Calorimetria differenziale a scansione
Cinetica e autoassociazione	Cinetica Biacore e autoassociazione

Tabella 19. Riassunto delle proprietà chimico-fisiche

di BNJ441

Prova	Carica modificante BNJ441	GMP BNJ441
Ultracentrifugazione analitica % di monomero	99.3 %	99.0 %
Analisi del peso molecolare MALDI-ToF- MS (Da)	148,484	148,522
Analisi del peso molecolare ESI-ToF-MS (Da)	Isoforma maggiore 147830.80 Campo 147,000 - 149,500	Isoforma maggiore 147830.72 Campo 147,000 - 149,500
Sequenziamento di N-terminale Catena pesante	PyroQ V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S	PyroQ V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S

Prova	Carica modificante BNJ441	GMP BNJ441
Sequenziamento di N-terminale Catena leggera	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T

Prova	Carica modificante BNJ441	GMP BNJ441
<u>Analisi degli amminoacidi (n.)</u>	<u>residui per molecola</u>	<u>residui per molecola</u>
ASX (106)	105	102
GLX (138)	137	135
SER (166)	170	167
GLY (84)	89	88
HIS (22)	26	26
ARG (36)	42	42
THR (110)	106	105
ALA (64)	68	67
PRO (88)	93	92
TYR (54)	51	53
VAL (128)	127	129
MET (12)	11	11
ILE (28)	26	27
LEU (94)	92	94
PHE (50)	51	51
LYS (82)	68	73

Prova	Carica modificante BNJ441	GMP BNJ411
Dicroismo circolare		
<u>Caratteristica nel vicino UV</u>	<u>Vicino UV (nm)</u>	<u>Vicino UV (nm)</u>
max	295	295
min	269	269
max	266	266
min	262	262
	250	250
<u>Caratteristica nel lontano UV</u>	<u>Lontano UV (nm)</u>	<u>Lontano UV (nm)</u>
spalla	239-231	239-231
max	218	218
min	201	202
<u>Deconvoluzione</u>	<u>Decon</u>	<u>Decon</u>
α -elica	0.030	0.030
3/10 elica	0.026	0.026
β -foglietto	0.328	0.334
Ripiegamenti	0.156	0.158
Poli (Pro) II	0.059	0.061
<u>Non ordinato</u>	<u>0.397</u>	<u>0.388</u>
Totale ¹	0.996	0.997
<u>Oligosaccaridi (MALDI-ToF-MS)</u>	<u>m/z (M+Na)⁺</u>	<u>m/z (M+Na)⁺</u>
G1F	1647.61	1647.55
G1	1501.52	1501.49
G0F	1485.56	1485.51
G0	1339.47	1339.49
G0F-GN	1282.46	1282.39
Man-5	1257.43	1257.48

Prova	Carica modificante BNJ441	GMP BNJ441
<u>Oligosaccaride</u>	<u>%</u>	<u>%</u>
M3N2F	0.00	0.00
G0F-GN	0.66	0.93
G0F	90.45	91.26
G1F	8.79	7.7
G2F	0.00	0.00
Man-5	0.09	0.12
aGal1	0.00	0.00
Man-6	0.00	0.00
aGal2	0.00	0.00
Man-7	0.00	0.00
aGal3	0.00	0.00
SA1-1	0.00	0.00
SA1-2	0.00	0.00
SA1/aGal4	0.00	0.00
SA1-3	0.00	0.00
SA1-4	0.00	0.00
SA2-1	0.00	0.00
SA2-2	0.00	0.00
Totale G0F, G1F, G2F	99.24	98.96
Acido	0.00	0.00
Alto mannosio	0.09	0.12
aGal	0.00	0.00
Neutro	99.99	100.01
Monosialilato	0.00	0.00
Disialilato	0.00	0.00

Prova	Carica modificante BNJ441	GMP BNJ441
<u>Monosaccaride</u>	<u>(nmole mono/ mg proteina)</u>	<u>(nmole mono/ mg proteina)</u>
GlcNAc	22.14	29.26
GalNAc	0.00	0.00
Galattosio	0.66	0.82
Mannosio	20.25	23.24
Fucosio	5.38	6.53
Totale	48	60
%	0.93 %	1.16 %
<u>Acido sialico</u>	<u>(mmole /mole)</u>	<u>(mmole /mole)</u>
NGNA	ND	ND
NANA	< LoQ	< LoQ
<u>Calorimetria</u>	67.0°C	67.0°C
<u>T_m</u>		
<u>Cinetica Biacore</u>	4.44e ⁵	4.86e ⁵
k _a (1/Ms)	2.05e ⁻⁴	2.04e ⁻⁴
K _d (1/s)	4.61e ⁻¹⁰	4.21e ⁻¹⁰
K _D (M)	0.0257	0.0347
Chi ²		
<u>Autoassociazione Biacore</u>	7.12e ⁻³	2.71e ⁻⁴
K _D (M)	0.147	0.359
Chi ²		

La tabella 19 mostra il peso molecolare intatto determinato per la carica modificante, pari a 147830,80 Da e per la carica di GMP pari a 147830,72 Da. I valori sono coerenti con il valore del peso molecolare del componente principale calcolato per

BNJ441 di 147.827,62 Da nella tabella 17, e con una precisione di massa entro 100 ppm di ESI-ToF-MS tarata esternamente. Non sono stati osservati picchi principali oltre il campo di 147.000-149.500 Da. Questo metodo ha identificato la molecola sulla base del peso molecolare intatto.

La tabella 19 mostra la sequenza del terminale T determinata per le cariche di BNJ441. Le sequenze del terminale T determinate della catena pesante e della catena leggera erano coerenti con la sequenza di amminoacidi per le cariche di BNJ441. È stato trovato che la catena pesante viene bloccata con un PyroQ, come previsto, e viene sbloccata con amminopeptidasi piroglutammato (PGAP). Abbiamo determinato la sequenza primaria della proteina al terminale N della catena polipeptidica mediante analisi della degradazione di Edman sequenziale e analisi mediante HPLC.

La tabella 19 mostra i residui dell'analisi degli amminoacidi per molecola determinati per le cariche di BNJ441. Questi valori erano tutti coerenti con il numero di residui calcolati per molecola per BNJ441 sulla base della sequenza primaria, mostrati nella prima colonna della tabella 19. I dati dell'analisi degli amminoacidi sono stati acquisiti in triplicato. Questo metodo valuta la struttura prima-

ria della molecola mediante idrolisi acida della proteina nei suoi costituenti amminoacidi singoli. Questo metodo non rileva cisteina o triptofano. Asparagina e aspartato sono stati rilevati in un picco singolo e marcati Asx. La glutammina ed il glutammato vengono anche rilevati in un picco singolo e marcati Glx. Dei 20 amminoacidi standard, quattordici vengono rilevati solamente mediante questo metodo più i gruppi di Asx e Glx, per un totale di sedici amminoacidi. Di quelli rappresentati, BNJ441 ha un totale di 1.262 residui che possono venire rilevati mediante questi metodi.

La tabella 19 mostra la caratteristica locale del dicroismo circolare (CD) nel vicino UV, la caratteristica locale nell'UV lontano ed i risultati di deconvoluzione per le cariche di BNJ441. La deconvoluzione descrive la quantità di alfa elica, 3/10 elica, foglio beta, spire, poly (Pro)II e strutture non ordinate determinate mediante il software CDPro contro una dato gruppo di riferimento. Sono stati determinati gli spettri di CD per il vicino UV (struttura terziaria) e per l'UV lontano (struttura secondaria) per ciascuna carica. Questo metodo ha valutato la struttura molecolare dell'ordine maggiore (2° e 3°) nella molecola mediante assorbimento differenziale

della luce di destra e di sinistra polarizzata circolarmente presentata nelle bande di assorbimento delle molecole otticamente attive (chirali), come le proteine. La deconvoluzione degli spettri di CD è stata eseguita, ed i risultati sono mostrati nella tabella 19.

La tabella 19 mostra il peso molecolare medio di ciascun glicano determinato. Il peso molecolare dell'oligosaccaride N-legato oppure del glicano osservati per le cariche di BNJ441 era coerente con i pesi molecolari teorici dei glicani mostrati nella tabella 20. Gli spettri dei pesi molecolari dei glicani liberi sono stati determinati mediante spettrometria di massa MALDI-TOF. Questo metodo ha identificato i glicani associati alla molecola di farmaco mediante il peso molecolare. I glicani erano stati in precedenza scissi enzimaticamente dall'anticorpo con PNGasi F. I glicani sono stati quindi estratti in fase solida e miscelati con la soluzione della matrice dell'acido 3,4-diidrossibenzoico e co-precipitati sul bersaglio MALDI. Questo campione essiccato è stato ionizzato con un laser di azoto in un spettrometro di massa TOF. È stato raccolto uno spettro m/z $(M+Na)^+$.

Tabella 20. Peso molecolare teorico dei glicani

Struttura dei glicani	m/z (M+Na)+ teorico
G1F	1647.58
G1	1501.53
G0F	1485.53
G0	1339.47
G0F-GN	1282.45
Man-5	1257.41

Le percentuali di oligosaccaridi determinate per le cariche di BNJ441 sono mostrate nella tabella 19. Sono stati calcolati i totali per vari tipi di oligosaccaridi N-legati: (Total G0F, G1F), acido, ad alto contenuto di mannosio, neutro, monosialilato e disialilato. Gli oligosaccaridi N-legati contenevano solo oligosaccaridi neutri. Il livello di oligosaccaridi neutri era del 99,99 e del 100,0% per, rispettivamente, le cariche modificanti e di GMP. Gli oligosaccaridi sono stati rilevati usando HPLC ed i cromatogrammi sono stati valutati quantitativamente. Questo metodo valuta il modello di glicosilazione identificando gli oligosaccaridi N-legati associati alla molecola del farmaco sulla base del tempo di ritenzione degli oligosaccaridi enzimaticamente rilasciati e marcati in modo fluorescente. Questo metodo ha fornito una relativa abbondanza di ciascuna specie di oligosaccaride. In breve, gli oligosaccaridi sono stati

enzimaticamente scissi dall'anticorpo con PNGasi F e marcati con acido antranilico. L'eccesso di acido antranilico è stato rimosso usando una fase di filtrazione HILIC. I campioni sono stati iniettati su un sistema WAX-HPLC con una colonna Showa Denko Asahipak Amino e gli oligosaccaridi marcati sono stati rilevati con un rilevatore fluorescente; eccitazione a 360 nm ed emissione a 420 nm.

Le percentuali di oligosaccaridi sono state determinate per le cariche di BNJ441 e sono mostrate nella tabella 19. Le percentuali di monosaccaridi sono state determinate per i cinque monosaccaridi (GlcNAc, GalNAc, Galattosio, Mannosio, Fucosio) usando una marcatura con fluorescenza seguita da cromatografia ad elevata pressione a fase inversa (RP-HPLC). Questo saggio caratterizza il modello di glicosilazione determinando i monosaccaridi associati alla molecola del farmaco sulla base del tempo di ritenzione dei monosaccaridi marcati in modo fluorescente. In breve, l'idrolisi acida ha rimosso gli oligosaccaridi dalla proteina e nei suoi monosaccaridi costituenti. I monosaccaridi liberi sono stati quindi marcati con acido antranilico (AA) mediante amminazione riduttiva. I campioni sono stati quindi iniettati su un sistema RP-HPLC con una colonna Waters Symmetry® C-18

ed i monosaccaridi marcati con AA sono stati rilevati con un rilevatore a fluorescenza; eccitazione a 360 nm e emissione a 420 nm. I campioni sono stati testati in duplicato ed il valore riportato era una media dei due risultati.

Quindi abbiamo determinate gli acidi sialici, vale a dire l'acido N-acetilneuraminico (NANA), e l'acido N-glicolilneuraminico (NGNA). In ciascun caso, il contenuto di acido sialico NANA e NGNA determinato delle cariche di BNJ441 era al di sotto del limite di quantificazione (< 6 mmoli/mole), come mostrato nella tabella 19. Non è stato osservato alcun NGNA per una delle due cariche. Gli acidi sialici sono stati misurati separatamente mediante RP-HPLC dopo la marcatura a fluorescenza, ed usando una taratura a più punti. Questo metodo valuta il modello di glicosilazione determinando il tipo e la quantità relativa degli acidi sialici associati alla molecola del farmaco. Gli acidi sialici sono stati chimicamente scissi dall'anticorpo mediante incubazione con bisolfato di sodio, quindi marcati con O-fenilendiammina. I campioni sono stati iniettati su un sistema per RP-HPLC con una colonna Beckman C18 Ultrasphere e gli acidi sialici marcati sono stati rilevati con un rilevatore della fluorescenza (eccitazione 230 nm;

emissione 425 nm). I campioni sono stati testati in duplicato ed è stata riportata la media dei due risultati.

Il valore T_m determinato per ciascuna carica di BNJ441 era di $67,0^\circ\text{C}$, come mostrato nella tabella 19. Sono state eseguite scansioni mediante calorimetria differenziale a scansione (DSC) ed i dati della calorimetria acquisiti usando Micro-Cal VP-DSC mediante scansione ad una velocità di $75^\circ\text{C}/\text{h}$ da 20°C a 95°C . L'asse delle Y e le tarature della temperatura sono stati eseguiti prima della prova dei campioni. L'errore di deflessione in % dell'asse delle Y era < all'1% ed i punti medi di transizione erano all'interno del campo accettato di $\pm 0,2^\circ\text{C}$ sia per $28,2^\circ\text{C}$ sia per $75,9^\circ\text{C}$. I campioni sono stati scansionati rispetto ai bianchi aventi la stessa composizione del tampone e lo stesso volume. DSC misura l'entalpia (ΔH) della distensione dovuta a denaturazione da calore. Una biomolecola in soluzione è in equilibrio tra la conformazione nativa (ripiegata) ed il suo stato denaturato (disteso). Il punto medio di transizione (T_m) è la temperatura in cui il 50% della proteina si trova in una conformazione nativa ed il 50% viene denaturato. Il T_m di ciascun campione viene determinato misurando ΔH attraverso un gradiente di

temperatura nel campione in confronto a quello della cellula bianca.

Le affinità (K_D) per i materiali delle cariche modificante e di GMP erano rispettivamente di 461 pM e 421 nM, con buoni adattamenti. Le cinetiche di legame di ciascuna carica di BNJ441 sono mostrate nella tabella 19. La risonanza plasmonica di superficie (Biacore 3000) è stata usata per valutare le cinetiche di legame dell'anticorpo anti-C5 (BNJ441) con C5 umano. Le cinetiche di BNJ441 con C5 sono state determinate usando un metodo di cattura umano anti-Fc. Anti-Fc umano (KPL n. 01-10-20) diluito a 0,1 mg/ml in acetato di sodio 10 mM a pH 5,0 è stato immobilizzato su due celle a flusso di un chip CM5 per 8 minuti mediante accoppiamento con ammine. L'anticorpo anti-C5 (BNJ441) è stato diluito a 0,35 µg/ml in un tampone di prova (HBS-EP, HEPES 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,005% di P20, pH 7,4). L'anticorpo diluito è stato quindi iniettato nell'altra cella a flusso, seguito da iniezioni di C5 (0,19-6 nM) in entrambe le celle a flusso. La cella a flusso secondaria è stata usata come riferimento. La superficie è stata rigenerata ogni volta con HCl 20 mM, 0,01% P20 (100 µl/min, 200 µl di iniezione). I dati sono stati trattati con il modello di Langmuir 1:1 usando BIAevalua-

tion 4.1 con doppio riferimento.

Le affinità (K_D) per l'auto-associazione dei materiali delle cariche modificante e di GMP di BNJ441 erano di 7,1 mM e di 0,27 mM rispettivamente. Si veda la tabella 19. Gli adattamenti scarsi erano dovuti a livelli bassi di legame osservati per i materiali sia della carica modificante sia della carica di GMP di BNJ441, l'auto-associazione e l'affinità misurata erano al di sotto del livello del limite di rilevamento dello strumento. Un basso livello di auto-associazione è vantaggioso per la fabbricabilità ed infine per la somministrazione ai pazienti. I sensorgrammi non vengono mostrati. La risonanza plasmonica di superficie (Biacore 3000) è stata usata per valutare le cinetiche di auto-associazione dell'anticorpo anti-C5 (BNJ441). Le cinetiche di auto-associazione di BNJ441 sono state determinate mediante immobilizzazione diretta dell'anticorpo (BNJ441). BNJ441 è stato diluito ad approssimativamente 31 $\mu\text{g/ml}$ in acetato di sodio 10 mM, pH 5,0, ed è stato immobilizzato su una cella a flusso di un chip CM5 ottenendo 2000 RU mediante accoppiamento con ammine. Una cella a flusso secondaria è stata usata come riferimento. Dopo le diluizioni dell'anticorpo anti-C5, BNJ441 (1,6 - 50 μM in un tampone di prova, HBS-EP, HEPES 0,01 M,

NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,005% di P20, pH 7,4) è stato quindi iniettato in entrambe le celle a flusso. Non è stata necessaria alcuna rigenerazione a causa del legame scarso. I dati sono stati trattati con un modello di affinità allo stato solido usando BIAevaluation 4.1 con doppio riferimento.

La caratterizzazione chimico-fisica di BNJ441 è stata eseguita usando le cariche modificante e di GMP ed è stato mostrato che è coerente con la sequenza di amminoacidi per l'anticorpo. I dati chimico-fisici riassunti in questo esempio comprendono un campo di proprietà comprendenti purezza, dimensione molecolare, identità, struttura, glicosilazione, termostabilità, cinetiche ed auto-associazione, e si prevede che agiscano come base per la caratterizzazione della sostanza farmaceutica in blocco di BNJ441.

RIVENDICAZIONI

1. Anticorpo isolato, oppure suo frammento legante l'antigene, che:

(a) si lega al componente del complemento C5 umano;

(b) inibisce la scissione di C5 in frammenti C5a e C5b; e

(c) comprende: (i) una regione CDR1 di catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi rap-

presentata nella SEQ ID n. 23, (ii) una regione CDR2 di catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi rappresentata nella SEQ ID n. 19, (iii) una regione CDR3 di catena pesante comprendente la sequenza di amminoacidi rappresentata nella SEQ ID n. 3, (iv) una regione CDR1 di catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi rappresentata nella SEQ ID n. 4, (v) una regione CDR2 di catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi rappresentata nella SEQ ID n. 5, e (vi) una regione CDR3 di catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi rappresentata nella SEQ ID n. 6.

2. Anticorpo isolato, oppure suo frammento legante l'antigene, secondo la rivendicazione 1, comprendente una regione variabile a catena pesante rappresentata nella SEQ ID n. 12 e una regione variabile a catena leggera rappresentata nella SEQ ID n. 8.

3. Anticorpo isolato, oppure suo frammento legante l'antigene, secondo la rivendicazione 1 oppure 2, comprendente inoltre una regione costante a catena pesante rappresentata nella SEQ ID n. 13.

4. Anticorpo isolato, oppure suo frammento legante l'antigene, secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, comprendente un polipeptide a catena pesante comprendente la sequenza di amminoaci-

di rappresentata nella SEQ ID n. 14 e un polipeptide a catena leggera comprendente la sequenza di amminoacidi rappresentata nella SEQ ID n. 11.

5. Anticorpo isolato, oppure suo frammento legante l'antigene, secondo la rivendicazione 1 oppure 2, comprendente inoltre una variante di regione costante di Fc umano, in cui la variante della regione costante di Fc umano comprende una metionina in posizione 428 e una asparagina in posizione 434, ciascuna secondo la numerazione dell'UE.

6. Anticorpo isolato, oppure suo frammento legante l'antigene, secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui l'anticorpo ha una semivita nel siero nell'uomo di almeno 25 giorni.

7. Anticorpo isolato, oppure suo frammento legante l'antigene, secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui l'anticorpo oppure un suo frammento legante l'antigene: (i) si lega a C5 umano a pH 7,4 e 25°C con una costante di dissociazione (K_D) per affinità che si trova nel campo di $0,1 \text{ nM} \leq K_D \leq 1 \text{ nM}$; oppure (ii) si lega a C5 umano a pH 6,0 e 25°C con una $K_D \geq 10 \text{ nm}$.

8. Anticorpo isolato, oppure suo frammento legante l'antigene, secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il rapporto [K_D del-

l'anticorpo oppure suo frammento legante l'antigene per C5 umano a pH 6,0 e a 25°C)/(K_D dell'anticorpo oppure suo frammento legante l'antigene per C5 umano a pH 7,4 e a 25°C)] è maggiore di 25.

9. Anticorpo isolato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui l'anticorpo viene prodotto in una cellula CHO.

10. Anticorpo isolato secondo la rivendicazione 9, in cui l'anticorpo non contiene residui di acido sialico rilevabili.

11. Composizione farmaceutica comprendente un veicolo farmaceuticamente accettabile e l'anticorpo oppure suo frammento legante l'antigene secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 10.

12. Kit terapeutico comprendente: (i) l'anticorpo isolato oppure suo frammento legante l'antigene secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 10; e (ii) mezzi per la somministrazione dell'anticorpo oppure del suo frammento legante l'antigene ad un uomo, in cui il mezzo è opzionalmente una siringa.

13. Articolo di fabbricazione comprendente:
un contenitore comprendente un marcatore; e
una composizione comprendente: (i) l'anticorpo isolato oppure suo frammento legante l'antigene secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 10, in

cui il marcatore indica che la composizione deve venire somministrata a un uomo avente, che si sospetta abbia, oppure a rischio di sviluppare, una condizione associata al complemento.

14. Anticorpo isolato, oppure suo frammento legante l'antigene, secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 10 per l'uso in un metodo per il trattamento di un paziente affetto da una condizione associata al complemento.

15. Anticorpo isolato, oppure suo frammento legante l'antigene, per l'uso secondo la rivendicazione 14, in cui la condizione associata al complemento è emoglobinuria parossistica notturna (PNH) oppure sindrome emolitico-uremica atipica (aHUS).

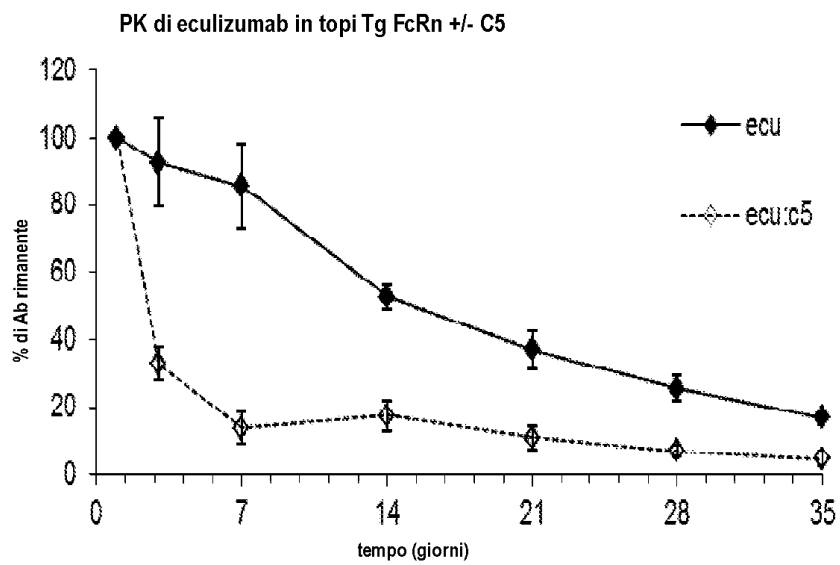
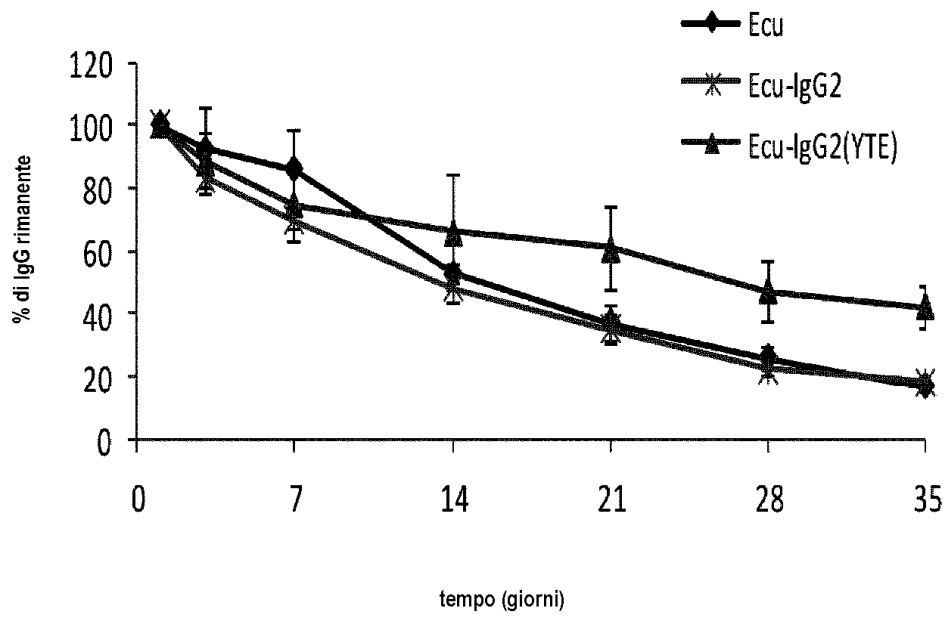
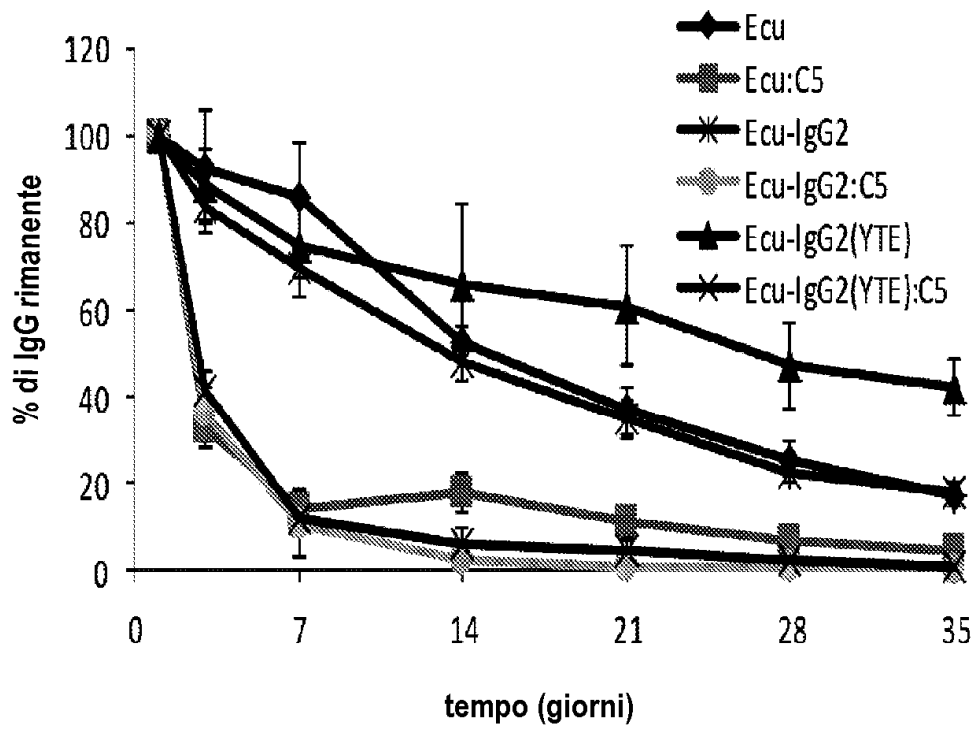


Fig. 1

**Fig. 2**

**Fig. 3**

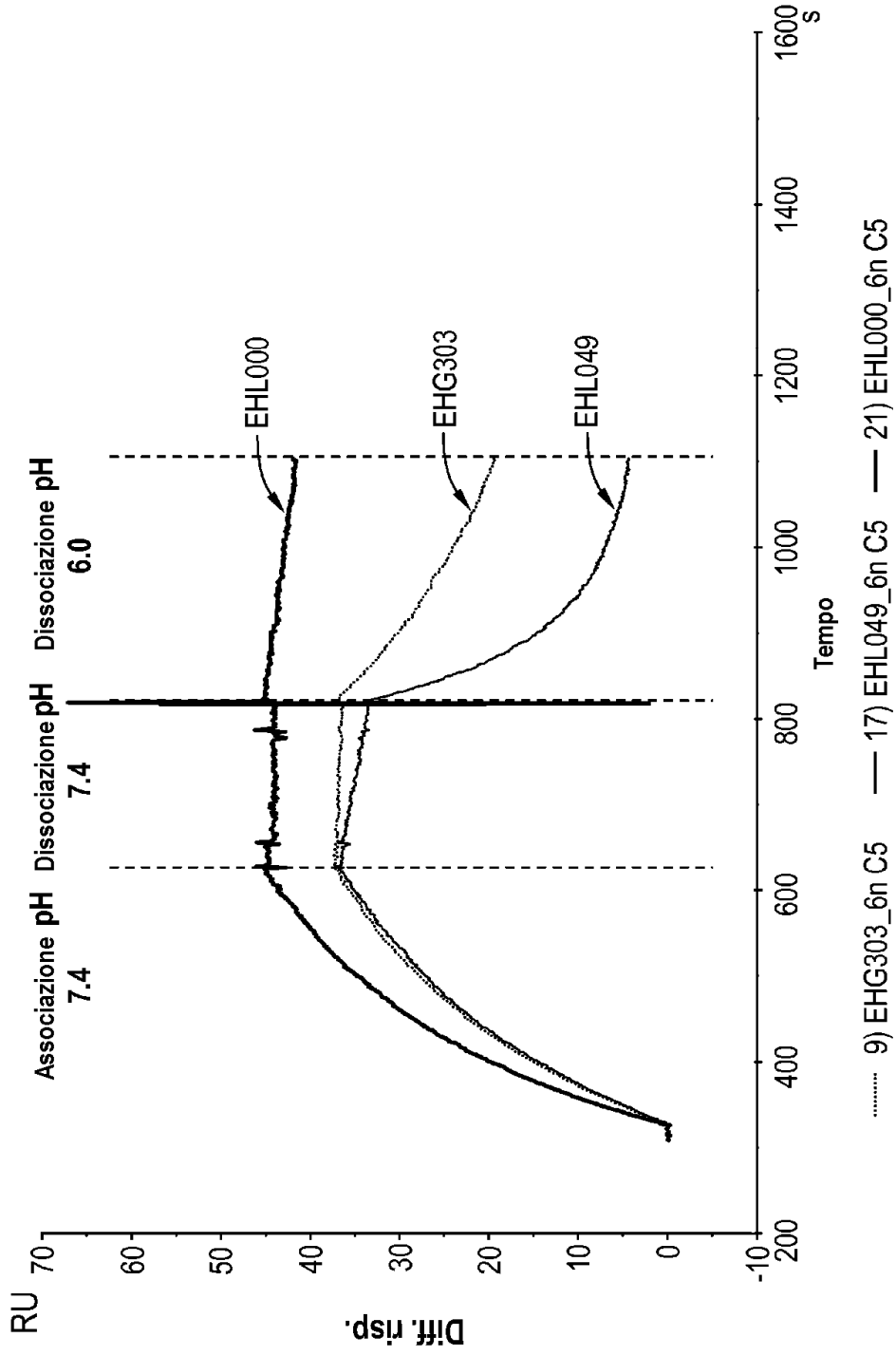


Fig. 4

Dissociazione di Y27H-S57H (EHG303) a pH 7,4 e 6,0

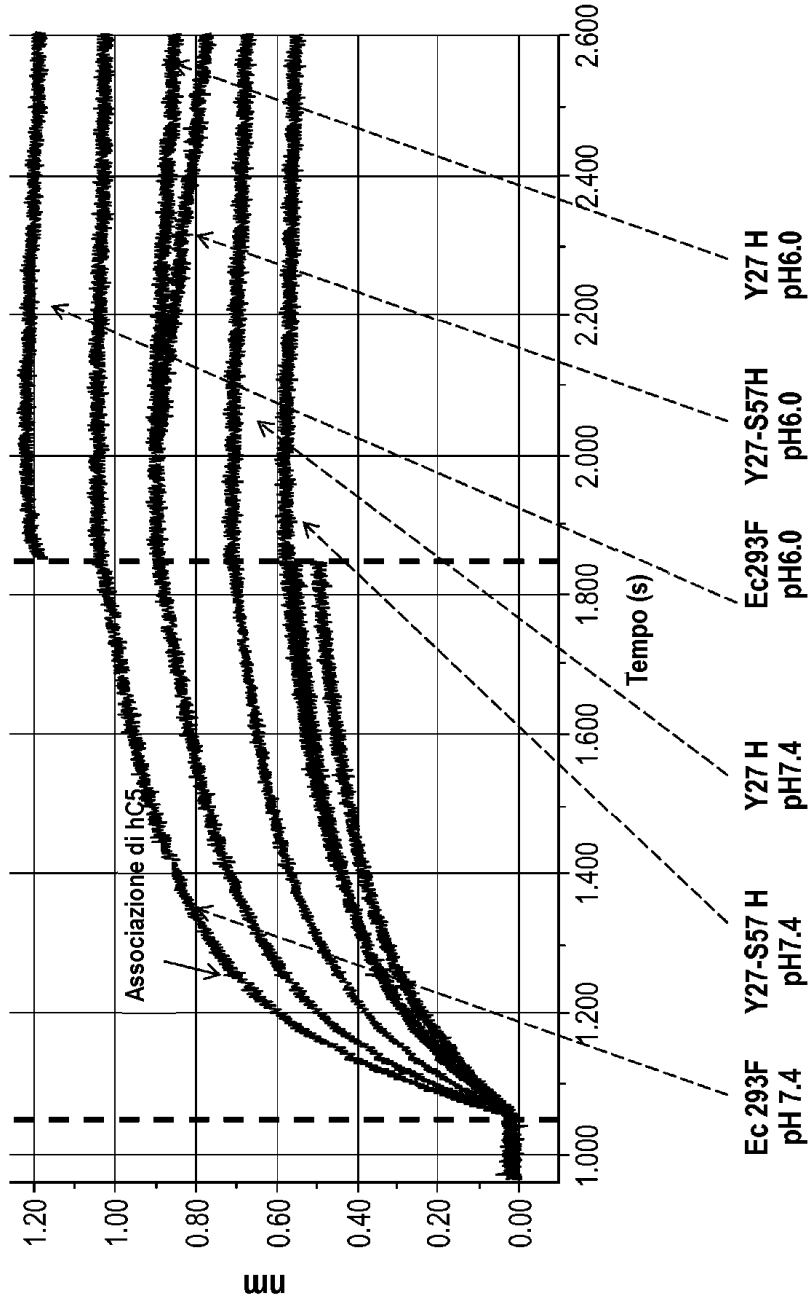


Fig. 5A

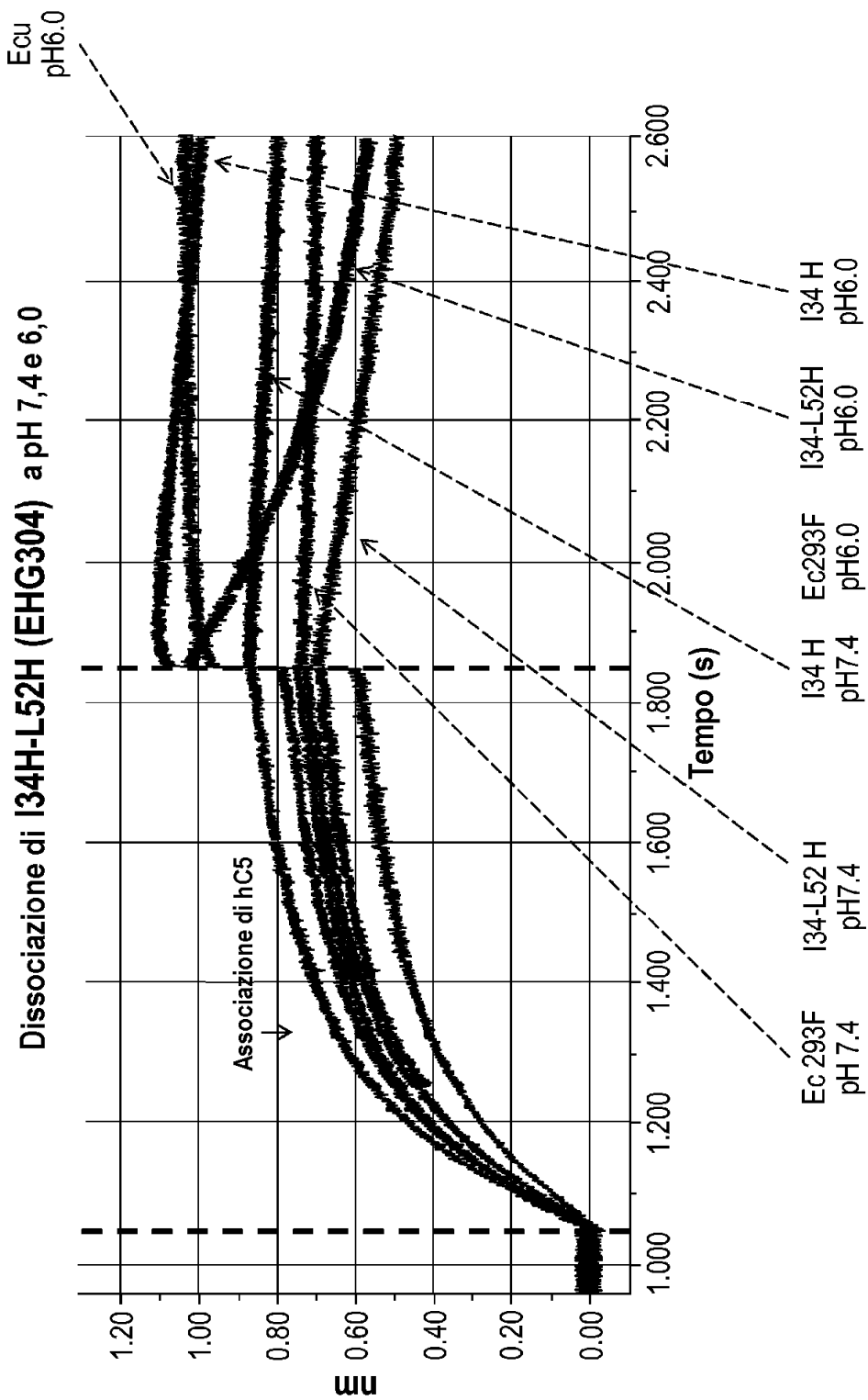


Fig. 5B

Dissociazione di Y27H-S57H (EHG303) a pH 7,4 e 6,0

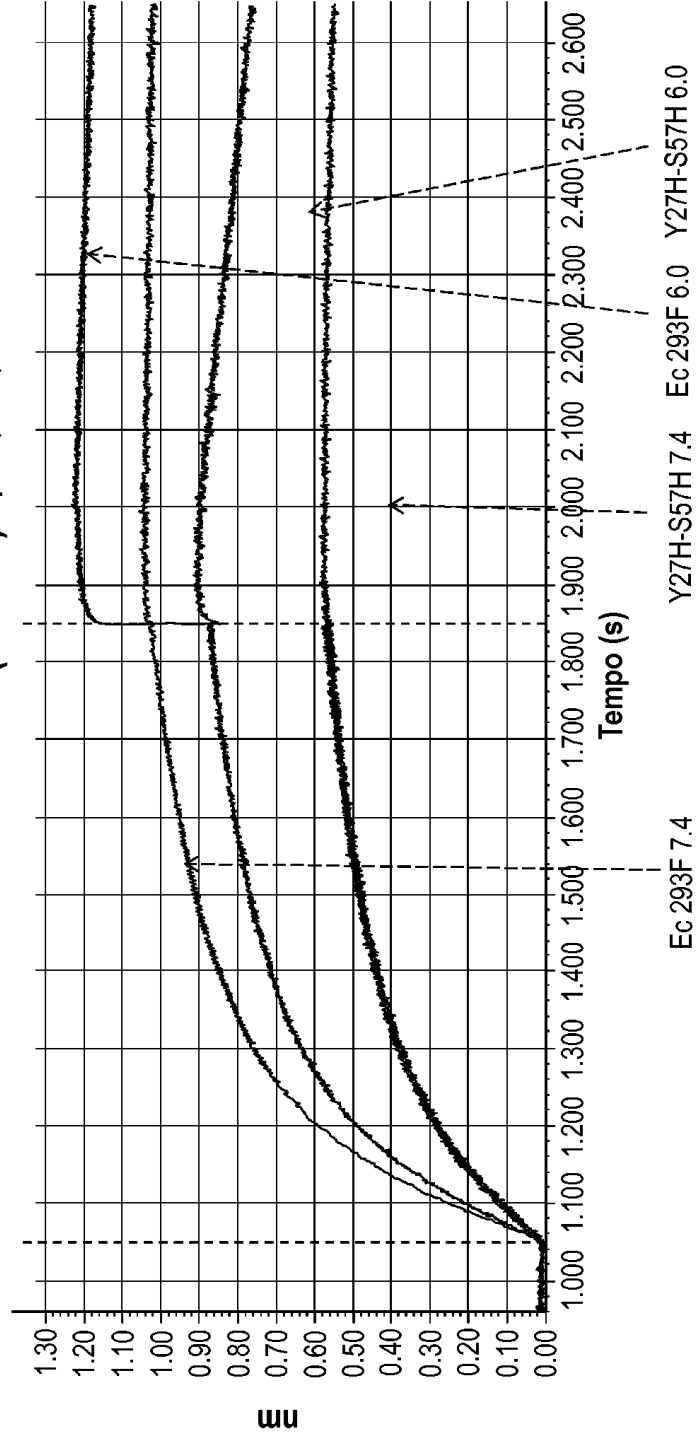


Fig. 5C

Ec 293F 7.4 Y27H-S57H 7.4 Ec 293F 6.0 Y27H-S57H 6.0

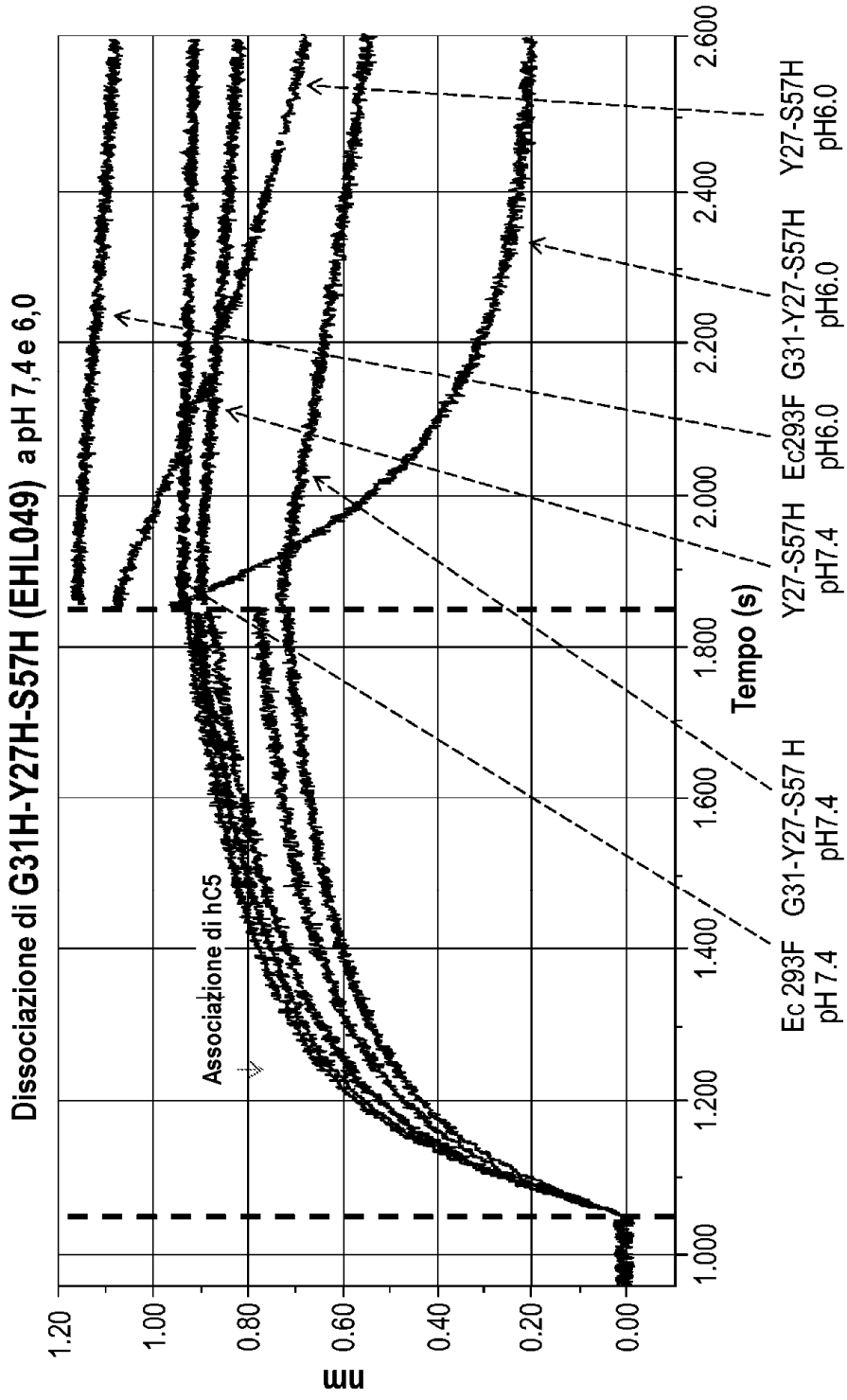


Fig. 5D

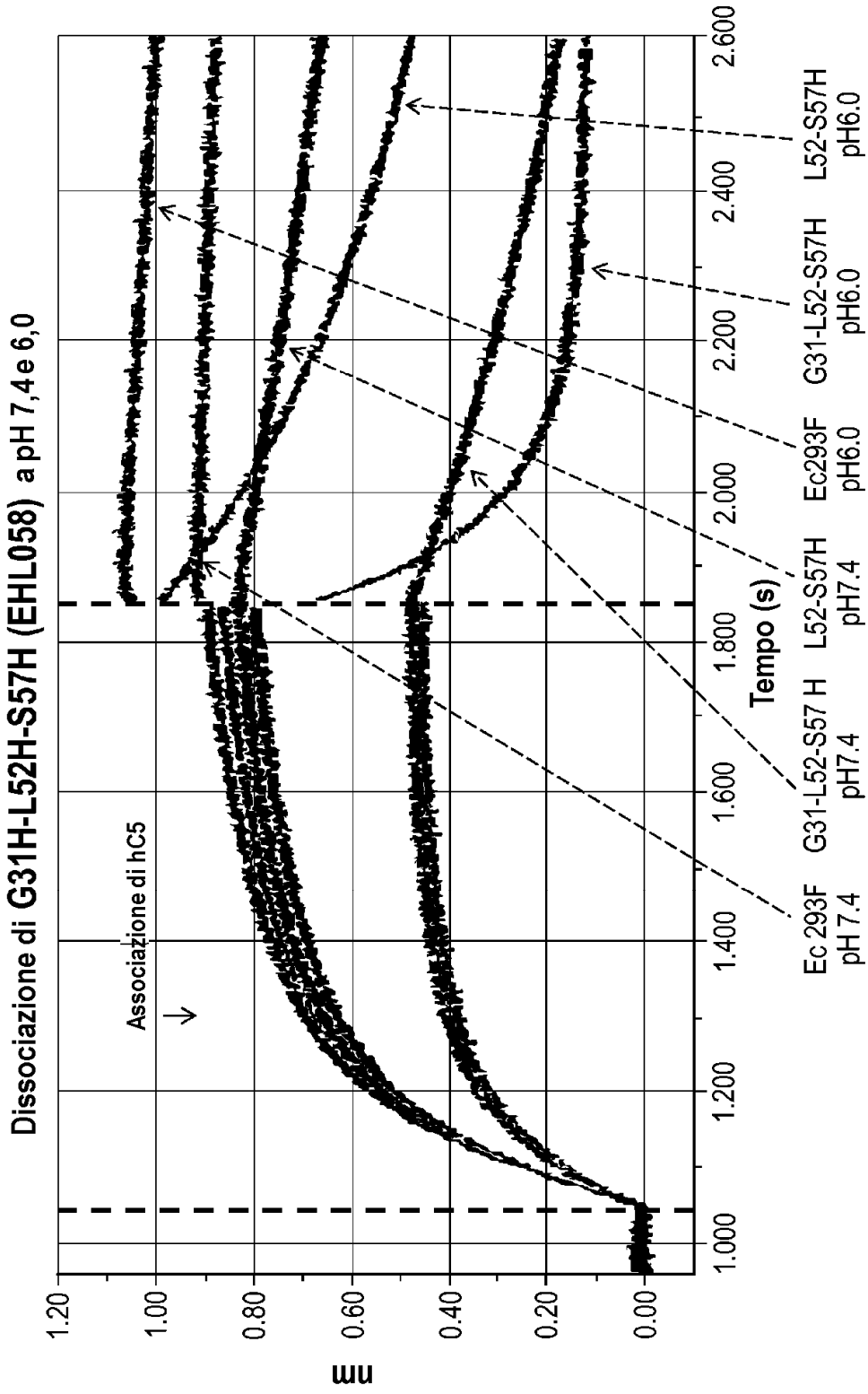


Fig. 5E

10/29

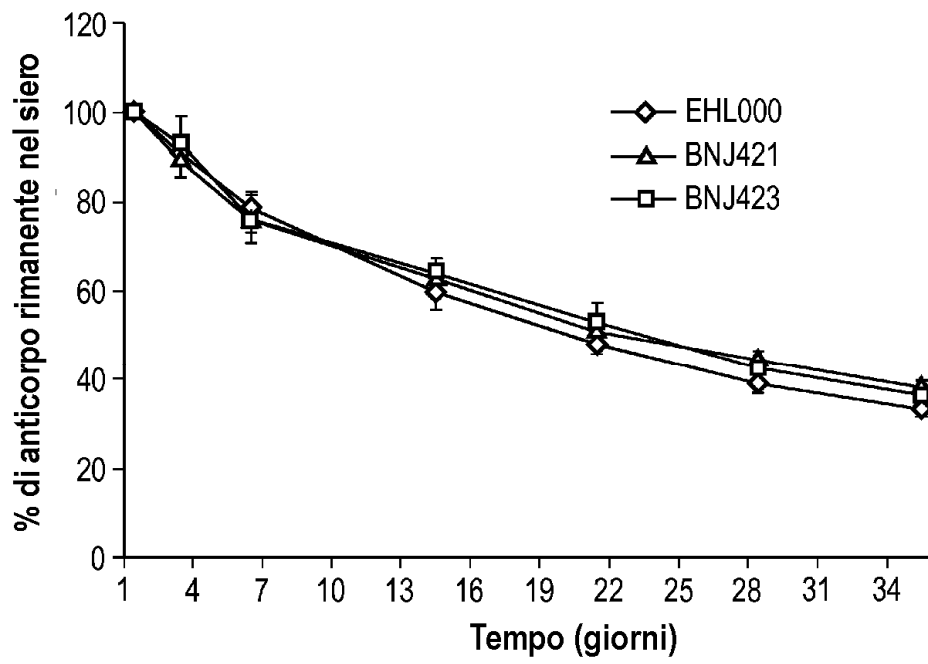


Fig. 6

11/29

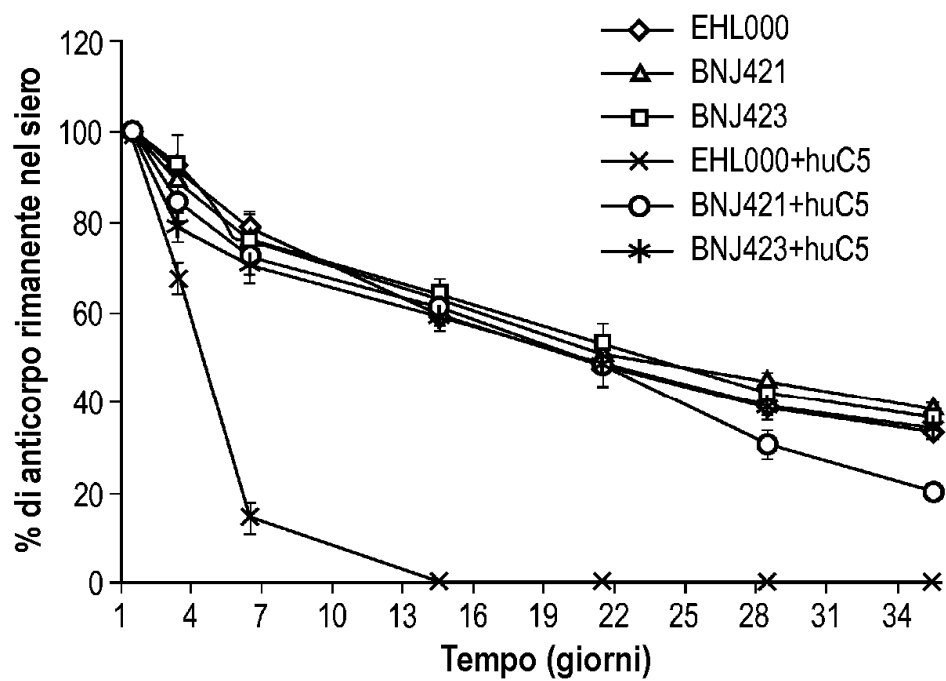
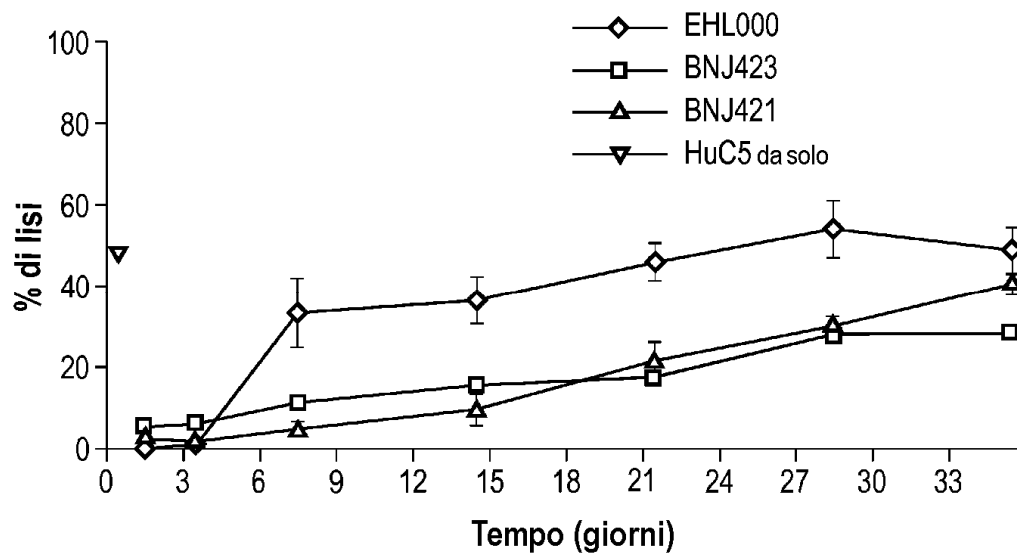


Fig. 7

Emolisi – Ex Vivo

**Fig. 8**

13/29

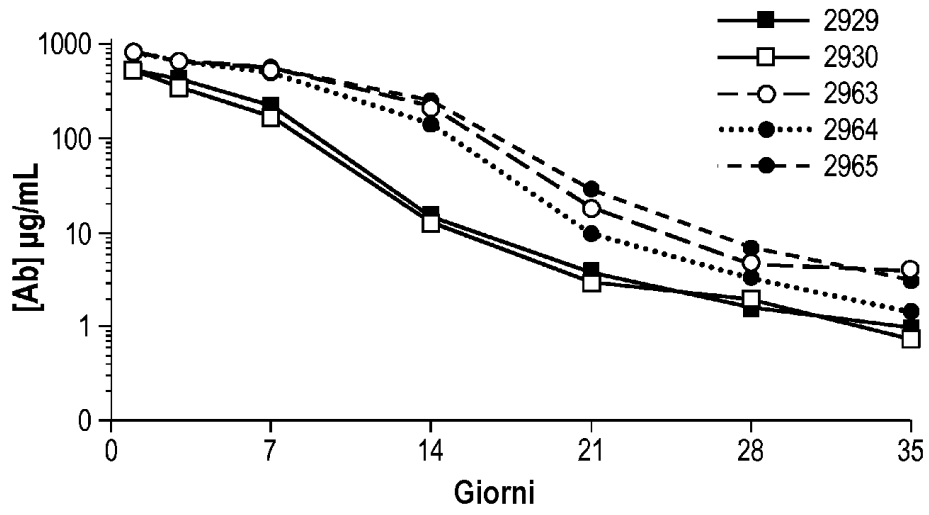


Fig. 9A

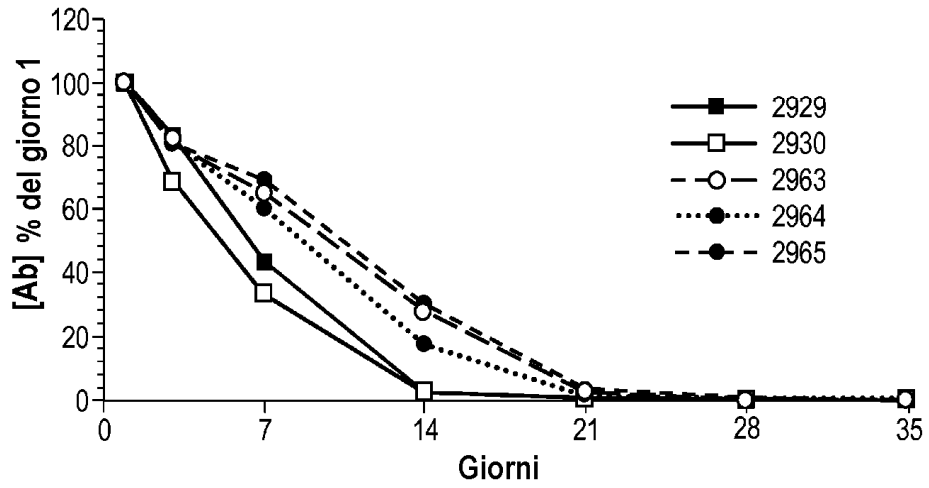


Fig. 9B

14/29

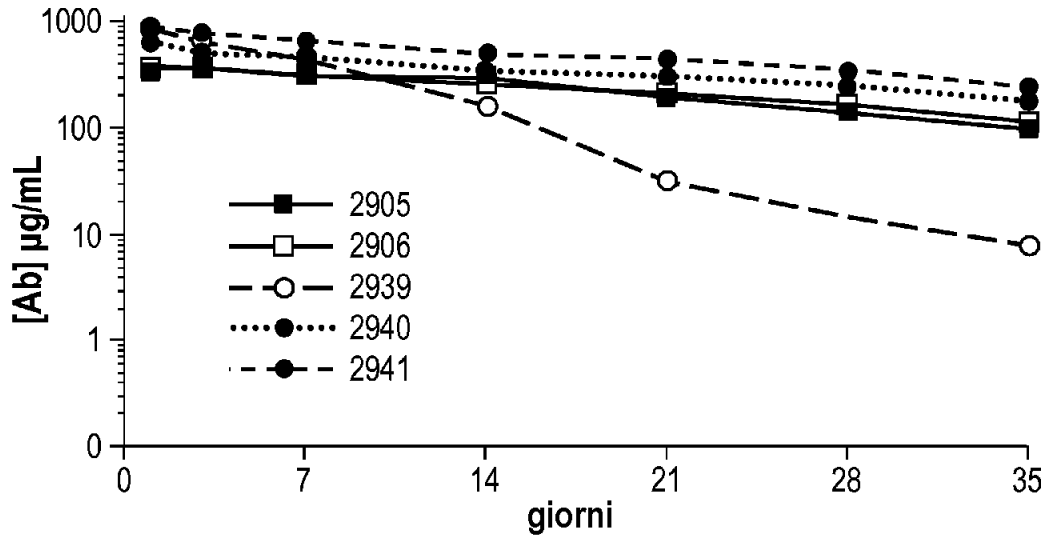


Fig. 10A

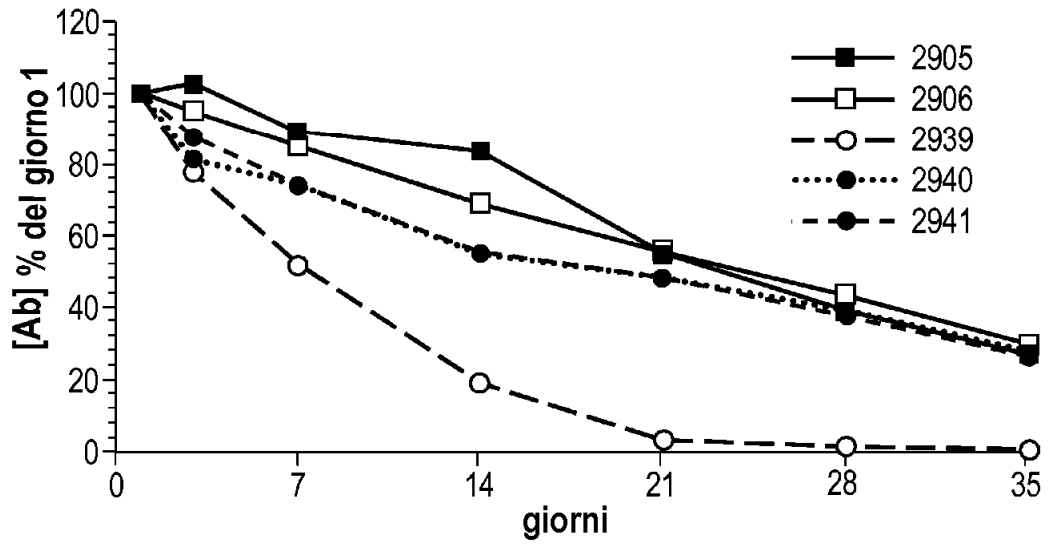


Fig. 10B

15/29

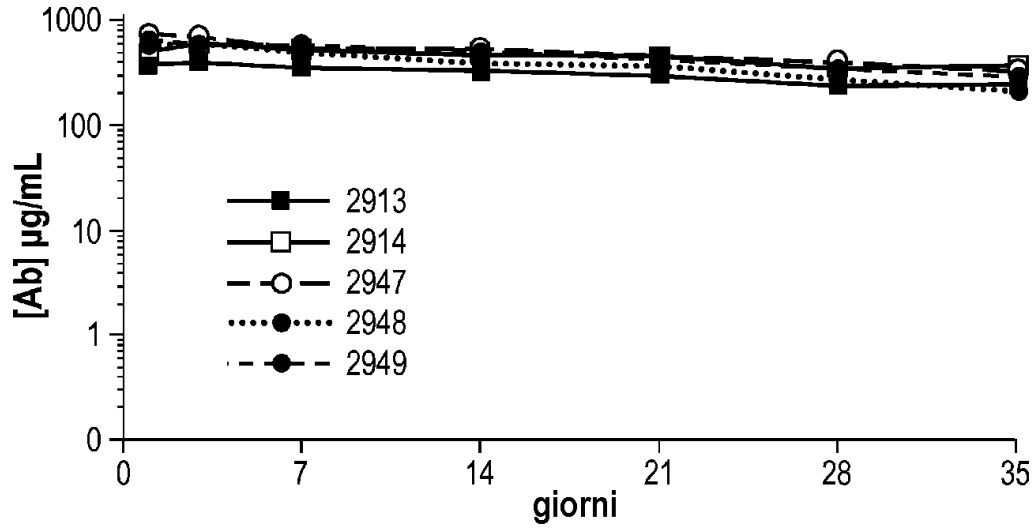


Fig. 11A

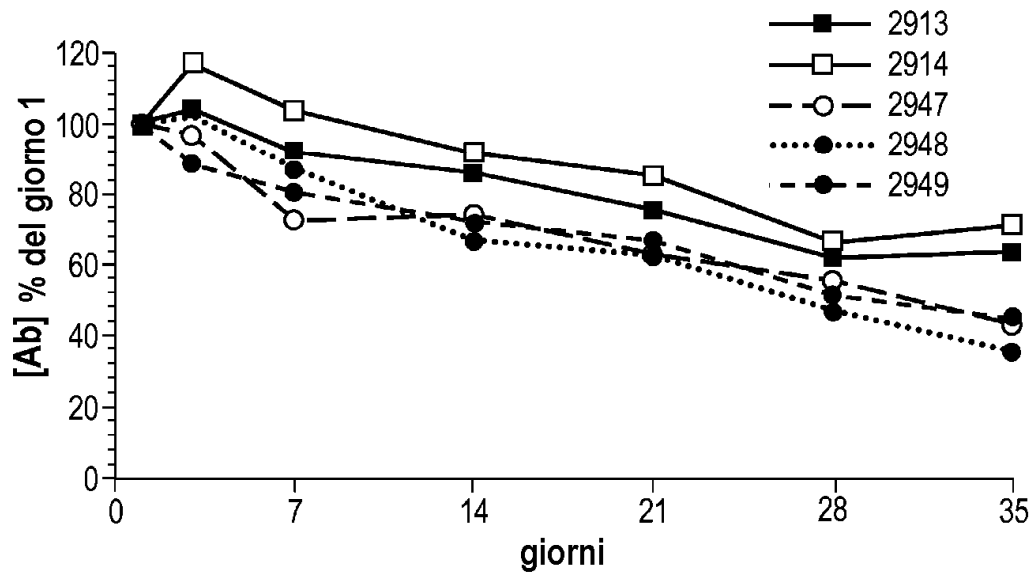
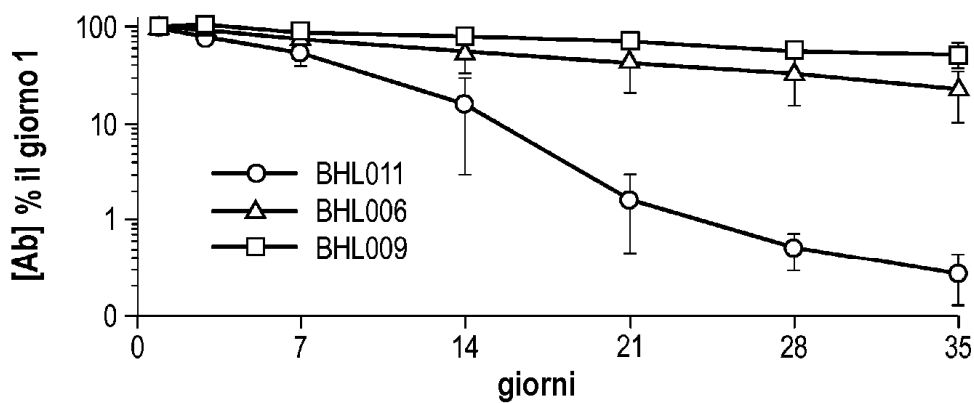
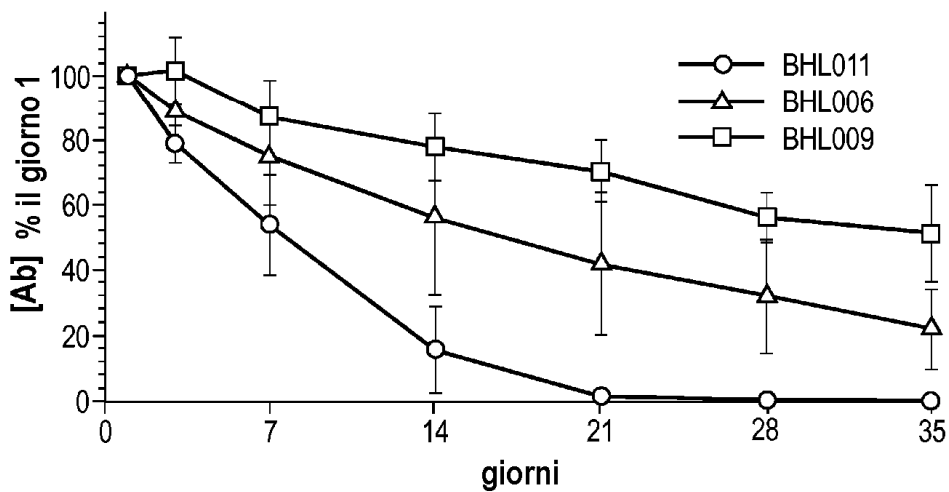
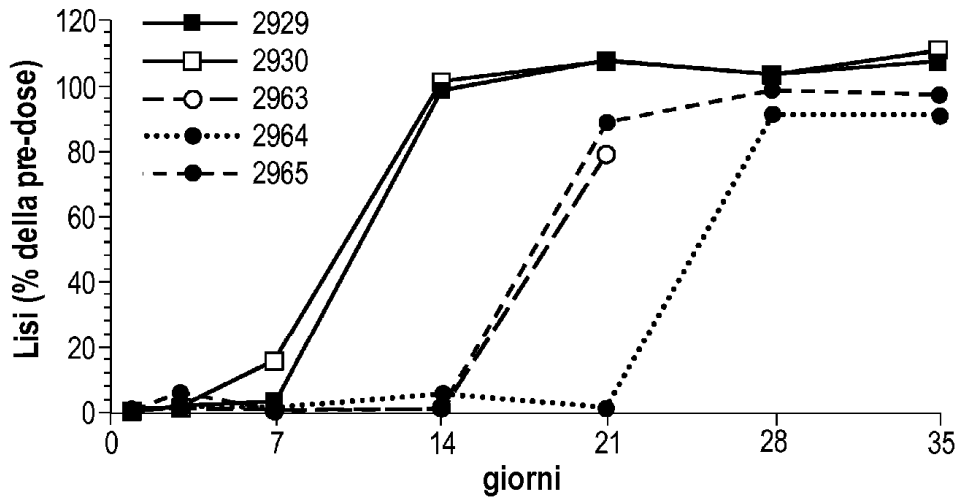
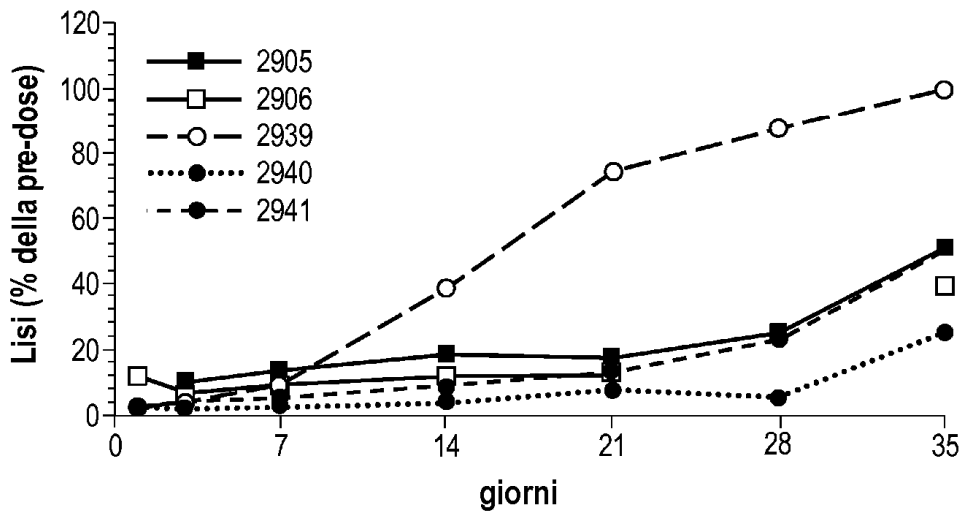


Fig. 11B

**Fig. 12****Fig. 13**

**Fig. 14****Fig. 15**

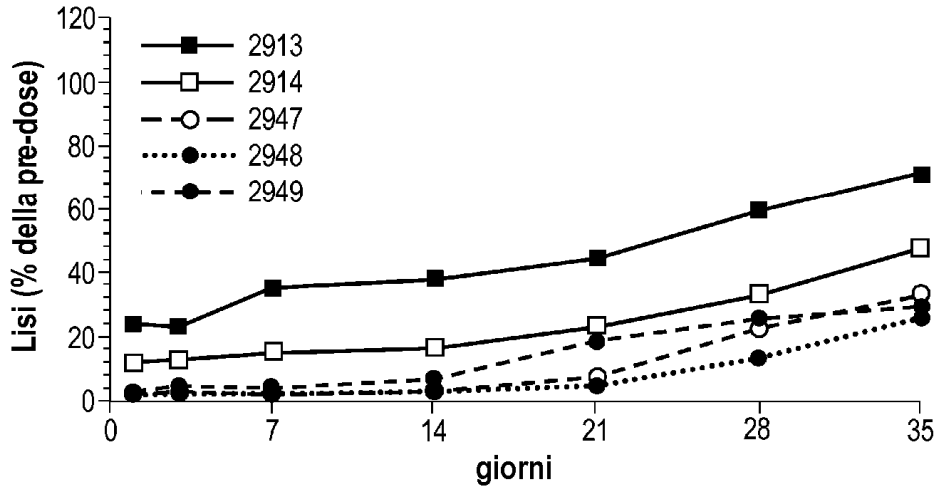


Fig. 16

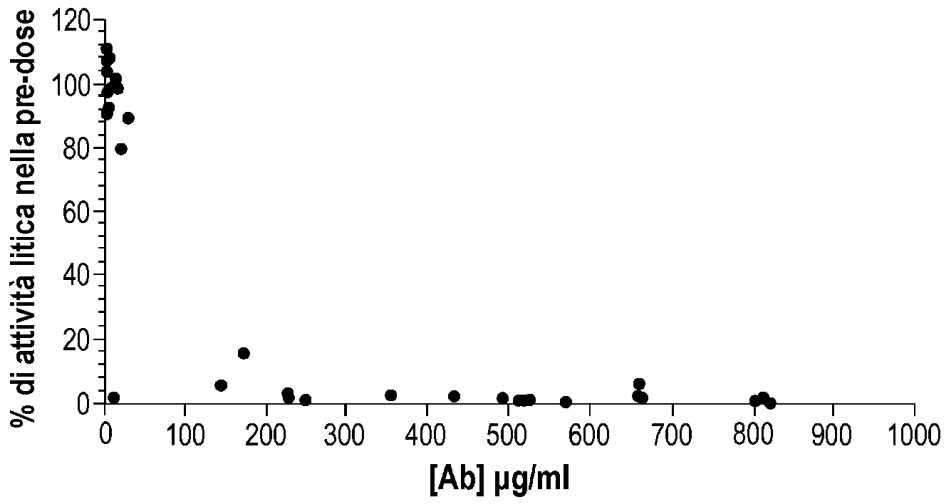


Fig. 17

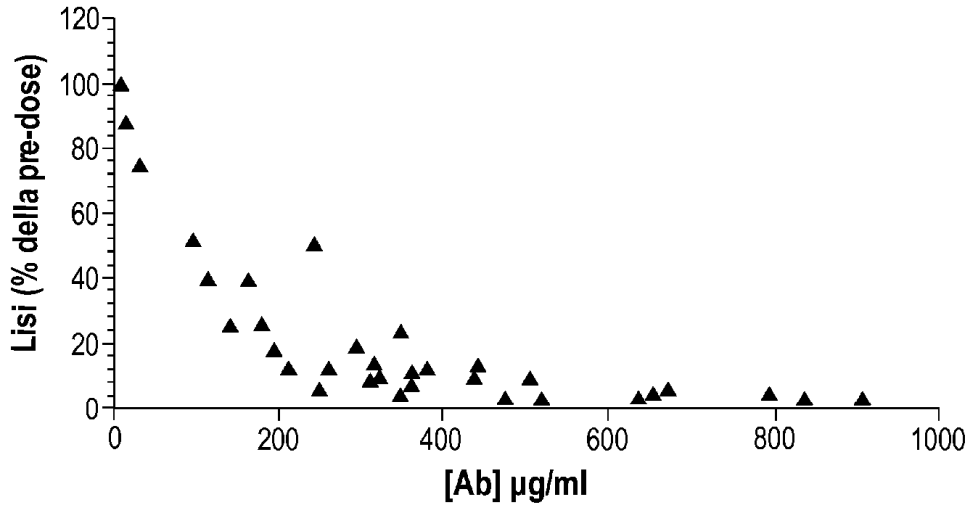


Fig. 18

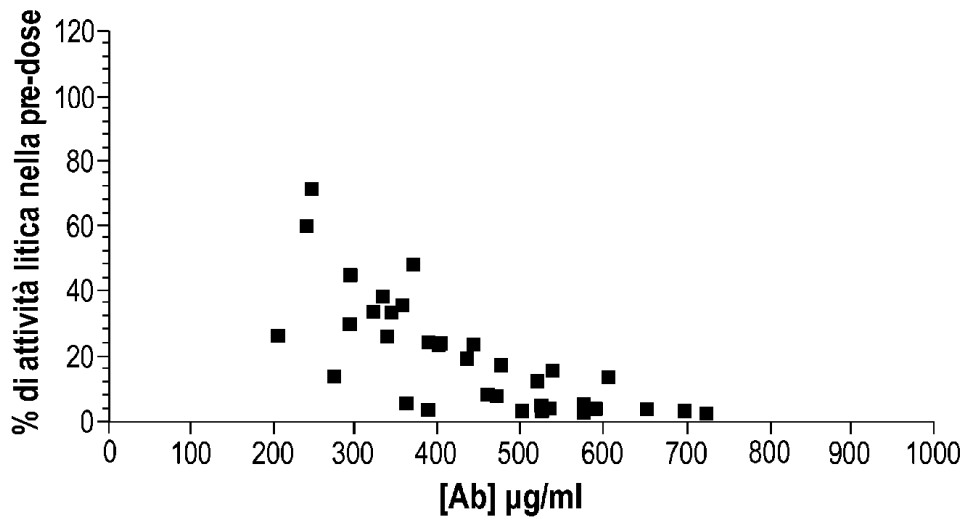


Fig. 19

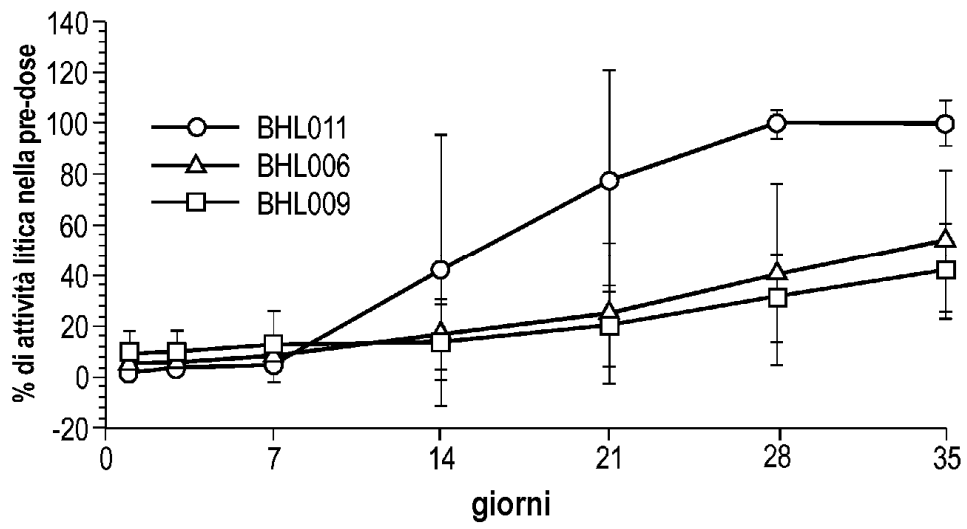
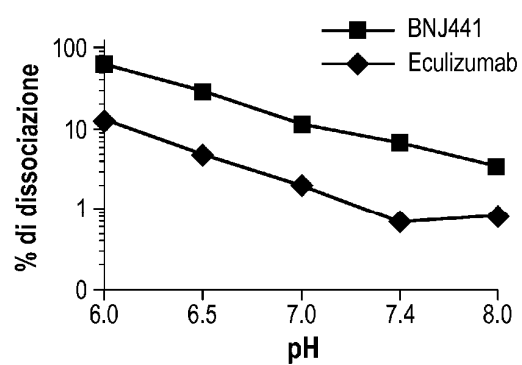
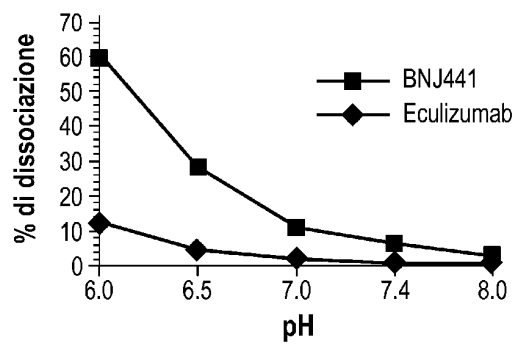
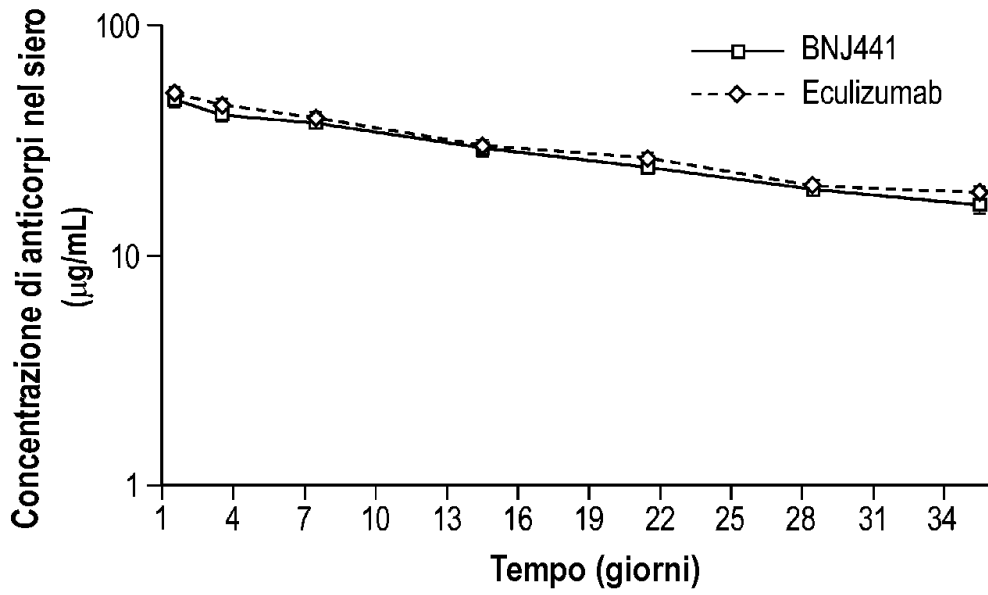
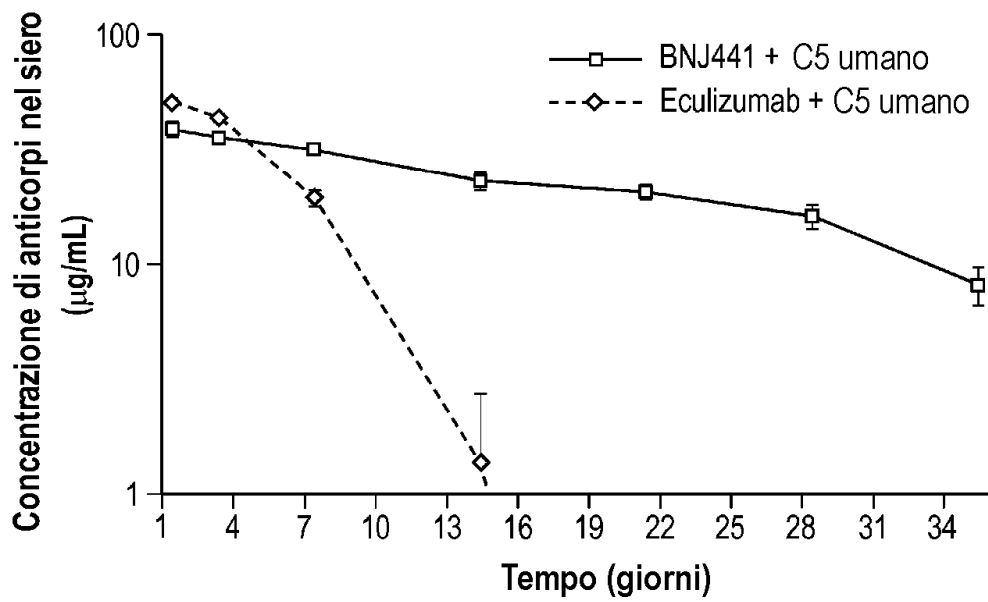


Fig. 20

**Fig. 21A****Fig. 21B**

**Fig. 22****Fig. 23**

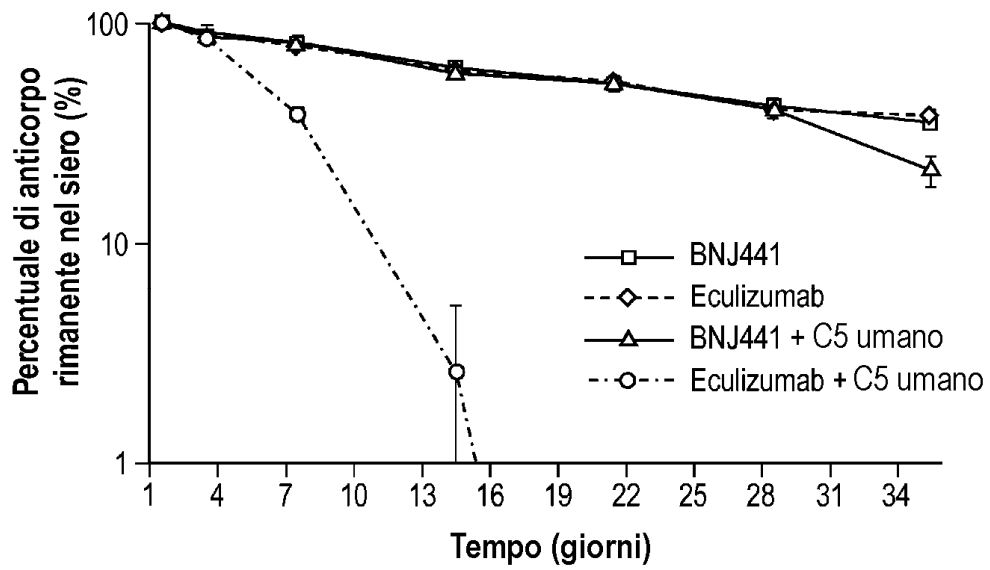


Fig. 24

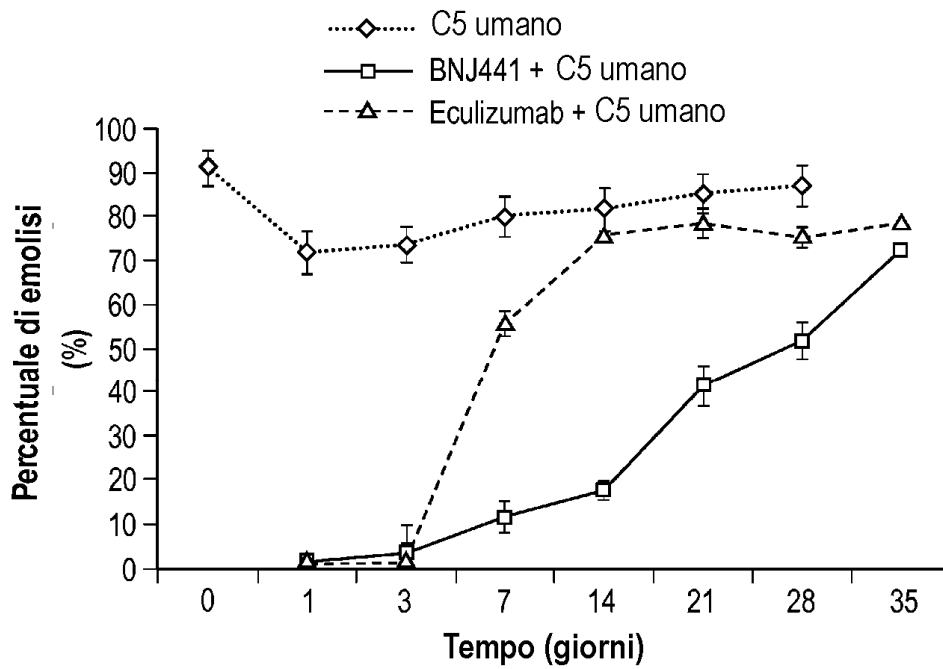
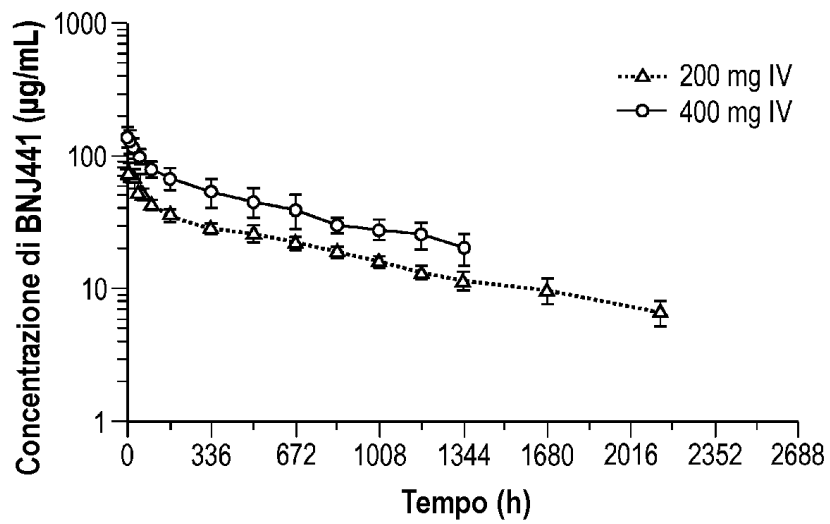
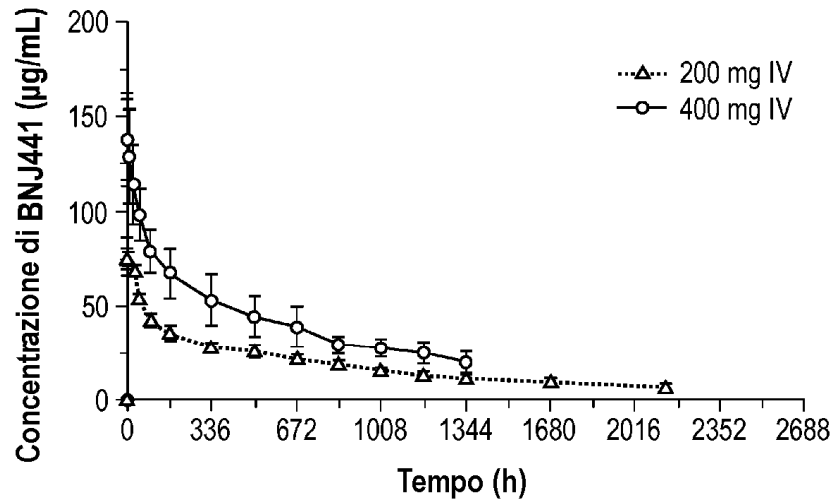


Fig. 25

**Fig. 26**

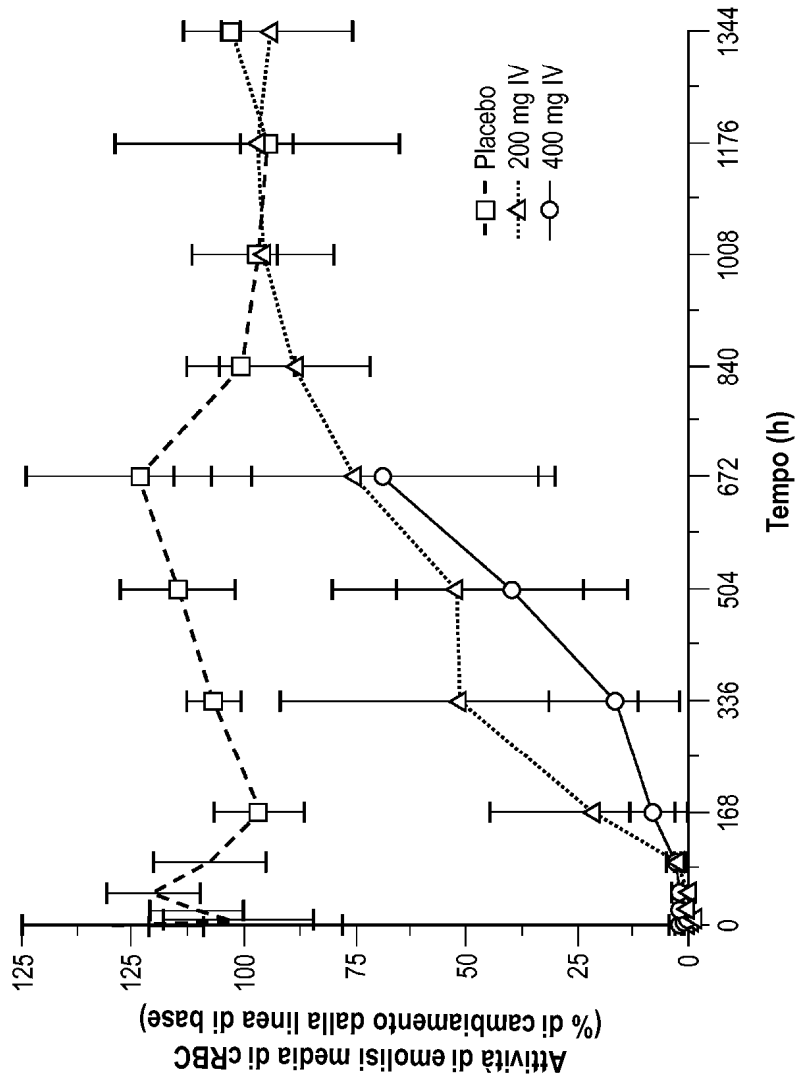
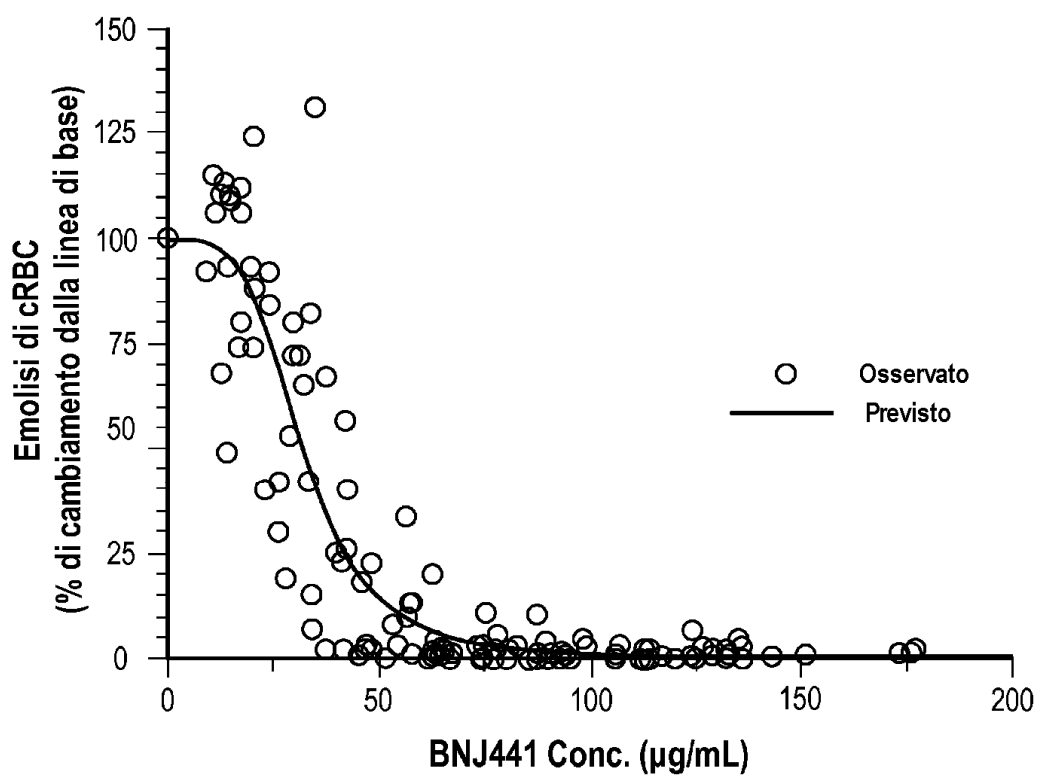
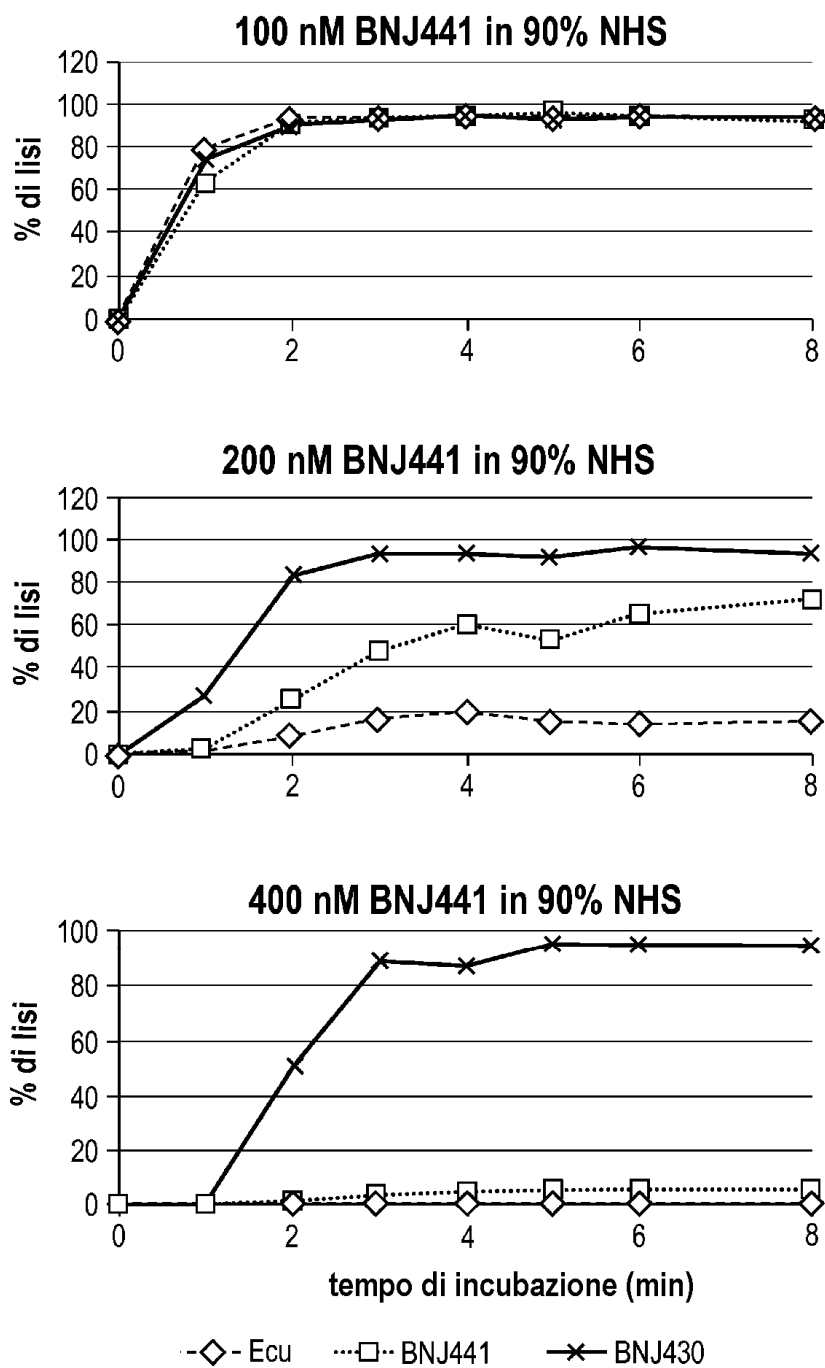


Fig. 27

**Fig. 28**

**Fig. 29**

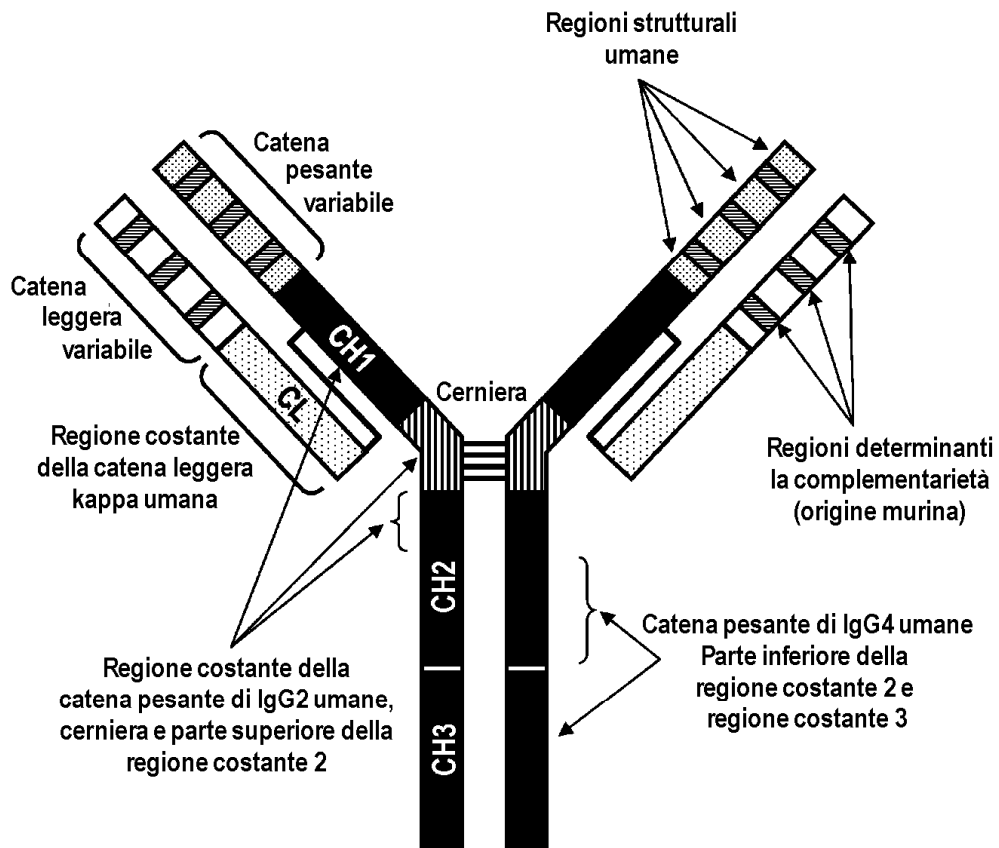
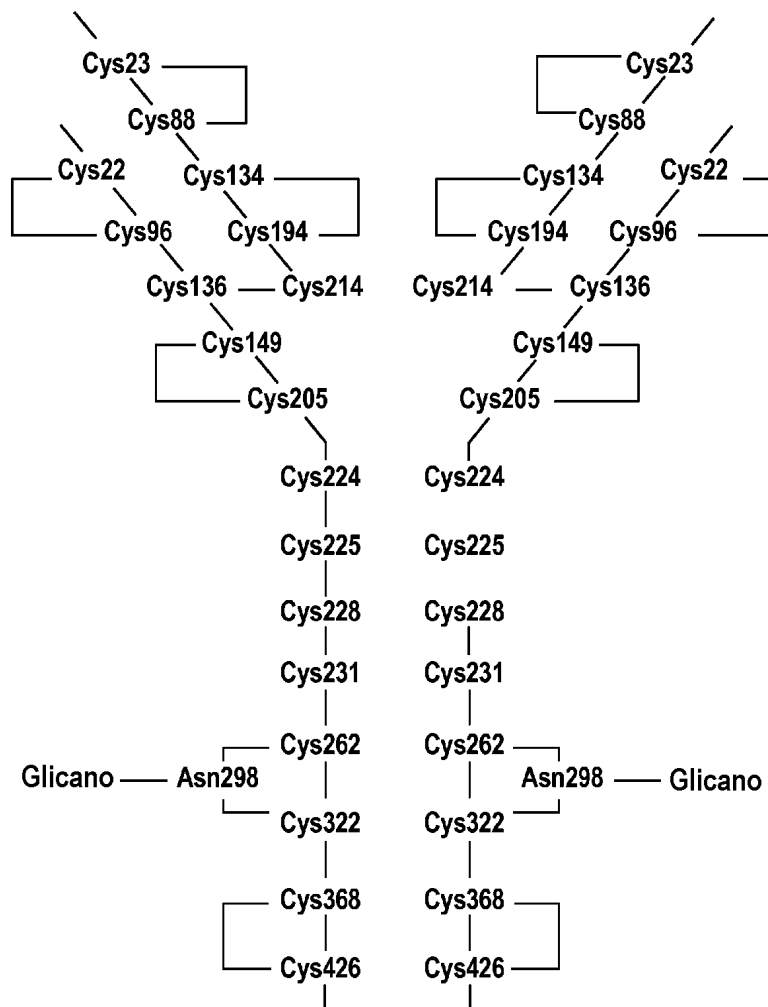


Fig. 30

**Fig. 31**