

Traduzione del testo del brevetto europeo

No. 4 374 922

a nome: Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

a: Tarrytown, NY 10591 - USA

dal titolo: Anticorpi anti-C5 e loro usi.

DESCRIZIONE

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione è correlata a un metodo per produrre anticorpi e frammenti di legame di antigene di anticorpi che si legano specificamente al fattore del complemento C5.

PRECEDENTE DELL'INVENZIONE

Il sistema del complemento è un gruppo di proteine plasmatiche che, quando attivate, portano alla lisi delle cellule bersaglio e facilitano la fagocitosi attraverso l'opsonizzazione. Il complemento viene attivato attraverso una serie di fasi proteolitiche da tre vie principali: la via classica, che viene tipicamente attivata da immuno-complessi, la via alternativa che può essere indotta da superfici cellulari non protette e la via della lectina legante il mannosio. Tutte e tre le vie della cascata del complemento convergono sul clivaggio proteolitico della proteina del componente del complemento 5 (C5).

Il clivaggio del componente del complemento 5 (C5) determina la produzione di frammenti C5a e C5b, un processo che è fondamentale durante l'attivazione della cascata del complemento. C5a può generare risposte fisiologiche pleiotropiche attraverso il legame con i suoi recettori (Monk *et al* 2007, *Br. J. Pharmacol.* 152: 429-448). C5a è un potente mediatore pro-infiammatorio che induce la migrazione chemiotattica, potenzia l'adesione cellulare, stimola lo scoppio ossidativo e induce il rilascio di vari mediatori infiammatori come l'istamina o le citochine. C5b media la formazione del complesso di attacco di membrana (MAC, o C5b-9) che porta alla lisi cellulare nelle fasi tardive della citotossicità dipendente dal complemento (CDC). Inoltre, nelle cellule nucleate che sono resistenti alla citolisi da parte di C5b-9, quantità sublitiche di C5b-9 possono causare l'attivazione cellulare che si traduce nella proliferazione cellulare, nella generazione di mediatori pro-infiammatori e nella produzione di matrice extracellulare.

Anticorpi monoclonali contro C5 sono noti nell'arte e sono stati descritti, per esempio, nel Brevetto US/Pubblicazioni N. 9206251, 9107861, 9079949, 9051365, 8999340, 8883158, 8241628, 7999081, 7432356,

7361339, 7279158, 6534058, 6355245, 6074642,
20160299305, 20160051673, 20160031975, 20150158936,
20140056888, 20130022615, 20120308559, e in
WO2015198243, WO2015134894, WO2015120130,
EP2563813B1, EP2328616B1, e EP2061810B1.

EP2328616B1 riguarda anticorpi che bersagliano la proteina del complemento C5 e composizioni e metodi di loro uso. Wong et al., *Transl Res.* 2015, 165(2):306-320 riguarda la terapia anticomplemento C5 con eculizumab per il trattamento dell'emoglobinuria notturna parossistica e della sindrome emolitico-uremica atipica. WO 2014/047500 A1 riguarda saggi di screening per antagonisti del componente C5 del complemento.

Anticorpi completamente umani che si legano specificamente alla proteina C5 con elevata affinità e hanno proprietà farmacocinetiche migliorate possono essere importanti nella prevenzione e nel trattamento di varie malattie associate a C5 (*per esempio*, sindrome emolitica uremica atipica).

BREVE SOMMARIO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione fornisce un metodo per produrre anticorpi e loro frammenti di legame di antigene che si legano specificamente alla proteina del fattore di complemento 5 (C5). Gli anticorpi

dell'invenzione comprendono una regione variabile di catena pesante (HCVR) comprendente la sequenza amminoacidica come esposto nella SEQ ID NO: 98, e una regione variabile di catena leggera (LCVR) comprendente la sequenza amminoacidica esposta nella SEQ ID NO: 106. Il metodo dell'invenzione comprende coltivare una cellula ospite comprendente una o più molecole di acido nucleico che codificano HCVR o LCVR dell'anticorpo o del frammento di legame di antigene dell'invenzione in condizioni che permettono la produzione dell'anticorpo o del frammento di legame di antigene. Gli anticorpi della presente invenzione sono utili, *inter alia*, per inibire o neutralizzare l'attività della proteina C5. Gli anticorpi possono essere utili per prevenire, trattare o migliorare almeno un sintomo o indicazione di una malattia o disturbo associato a C5 in un soggetto. Gli anticorpi possono essere somministrati in modo profilattico o terapeutico a un soggetto che ha o è a rischio di avere una malattia o disturbo associato a C5. In certe forme di realizzazione, gli anticorpi anti-C5 sono anticorpi completamente umani che si legano a C5 con elevata affinità e hanno proprietà farmacocinetiche (PK) e farmacodinamiche (PD) migliorate. Tali anticorpi ad alta affinità con PK/PD

migliorata possono essere usati per fornire un'efficacia superiore, insieme a un dosaggio meno frequente in un soggetto con una malattia o disturbo associato a C5.

Gli anticorpi dell'invenzione possono essere di lunghezza intera (per esempio, un anticorpo IgG1 o IgG4) o possono comprendere solo una porzione di legame di antigene (per esempio, un frammento Fab, F(ab')₂ o scFv), e possono essere modificati per influenzare la funzionalità, per esempio, per aumentare la persistenza nell'ospite o per eliminare le funzioni effettrici residue (Reddy *et al.*, 2000, *J. Immunol.* 164:1925-1933). In certe forme di realizzazione, gli anticorpi possono essere bispecifici.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi sono anticorpi monoclonali completamente umani.

Sommario degli insegnamenti tecnici

L'invenzione è definita nella rivendicazione indipendente. Ulteriori aspetti e forme di realizzazione preferite sono definiti nelle rivendicazioni dipendenti. Eventuali aspetti, forme di realizzazione ed esempi della presente divulgazione che non rientrano nella portata delle rivendicazioni allegate non fanno parte

dell'invenzione e sono semplicemente forniti per scopi illustrativi. In particolare, il metodo dell'invenzione è definito dalle rivendicazioni. Gli anticorpi anti-C5 sono elencati nelle Tabelle 1 e 2 nella presente. La Tabella 1 espone gli identificatori delle sequenze amminoacidiche delle regioni variabili di catena pesante (HCVR), delle regioni variabili di catena leggera (LCVR), delle regioni di determinazione di complementarità di catena pesante (HCDR1, HCDR2 e HCDR3), e delle regioni di determinazione di complementarità di catena leggera (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) di anticorpi anti-C5 esemplificativi. La Tabella 2 illustra gli identificatori delle sequenze di acido nucleico delle HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3 degli anticorpi anti-C5 esemplificativi.

Gli anticorpi anti-C5 esemplificativi elencati nella Tabella 1 hanno una coppia di sequenze amminoacidiche HCVR/LCVR è selezionata dal gruppo costituito dalle SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 98/114, 122/106, 98/130, 138/106, 146/106, 122/130, 146/114, 146/130, 138/130, 154/162, 170/178, 186/194, 202/210, 218/226, 234/242, 250/258, 266/258, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, e 338/346. In alcuni casi, la coppia di sequenze amminoacidiche di

HCVR/LCVR è selezionata da una delle SEQ ID NO: 50/58 (per esempio, H4H12161P), 98/106 (l'anticorpo dell'invenzione, per esempio, H4H12166P), 138/106 (per esempio, H4H12166P5), o 202/210 (per esempio, H4H12170P).

Il metodo dell'invenzione può anche comprendere recuperare l'anticorpo o il frammento di legame di antigene dalla cellula ospite. L'invenzione fornisce anche un metodo per produrre un anticorpo o un suo frammento di legame di antigene comprendente una catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 353. L'invenzione fornisce anche un metodo per produrre un anticorpo o un suo frammento di legame di antigene comprendente una catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 354. L'invenzione fornisce anche un metodo per produrre un anticorpo o suo frammento di legame di antigene comprendente una catena pesante e una catena leggera, in cui la catena pesante comprende la sequenza amminoacidica esposta nella SEQ ID NO: 353 e la catena leggera comprende la sequenza amminoacidica esposta nella SEQ ID NO: 354. Gli anticorpi, o loro frammenti di legame di antigene, divulgati nella presente possono comprendere un insieme di sei CDR (ovvero, HCDR1-

HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenuto all'interno di qualsiasi degli anticorpi anti-C5 esemplificativi elencati nella Tabella 1, come l'insieme di sequenze amminoacidiche di HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 selezionato dal gruppo costituito dalle SEQ ID NO: 52-54-56-60-62-64 (*per esempio*, H4H12161P), 100-102-104-108-110-112 (*per esempio*, H4H12166P), 140-142-144-108-110-112 (*per esempio*, H4H12166P5), e 204-206-208-212-214-216 (*per esempio*, H4H12170P).

Gli anticorpi, o loro frammenti di legame di antigene, divulgati nella presente possono comprendere un insieme di sei CDR (ovvero, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenuto all'interno di una coppia di sequenze amminoacidiche di HCVR/LCVR come definite da qualsiasi degli anticorpi anti-C5 esemplificativi elencati nella Tabella 1. Per esempio, anticorpi, o loro frammenti di legame di antigene, comprendenti l'insieme di sequenze amminoacidiche HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 contenuto all'interno di una coppia di sequenze amminoacidiche di HCVR/LCVR selezionate dal gruppo costituito dalle SEQ ID NO: 50/58 (*per esempio*, H4H12161P), 98/106 (l'anticorpo dell'invenzione, *per esempio*, H4H12166P), 138/106 (*per esempio*, H4H12166P5), o 202/210 (*per esempio*, H4H12170P).

Metodi e tecniche per identificare le CDR all'interno di sequenze amminoacidiche di HCVR e LCVR sono ben noti nell'arte e possono essere usati per identificare le CDR all'interno delle sequenze amminoacidiche di HCVR e/o LCVR specificate divulgate nella presente. Le convenzioni esemplificative che possono essere usate per identificare i confini delle CDR includono, *per esempio*, la definizione di Kabat, la definizione di Chothia, e la definizione di AbM. In termini generali, la definizione di Kabat si basa sulla variabilità di sequenza, la definizione di Chothia si basa sulla posizione delle regioni di anse strutturali, e la definizione di AbM è un compromesso tra gli approcci di Kabat e Chothia. *Si vedano, per esempio*, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); e Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Database pubblici sono anche disponibili per identificare sequenze CDR all'interno di un anticorpo.

Gli anticorpi anti-C5 descritti nella presente possono avere un motivo di glicosilazione modificato. In alcuni casi, può essere utile la modifica per rimuovere i siti di glicosilazione indesiderabili, o

un anticorpo privo di un gruppo funzionale di fucosio presente sulla catena di oligosaccaride, per esempio, per aumentare la funzione di citotossicità cellulare dipendente da anticorpo (ADCC) (si veda Shield *et al.* (2002) JBC 277:26733). In altre applicazioni, la modifica della galattosilazione può essere realizzata al fine di modificare la citotossicità dipendente dal complemento (CDC).

Gli anticorpi e i loro frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono presentare legame pH-dipendente a C5. Per esempio, gli anticorpi e i loro frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono legarsi a C5 con affinità superiore a pH neutro che a pH acido (ovvero, legame ridotto a pH acido).

Gli anticorpi e i frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono presentare proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche migliorate, per esempio, anticorpi anti-C5 che hanno un'emivita nel siero estesa. In alcuni casi, gli anticorpi anti-C5 hanno concentrazione nel siero superiore a 10 µg/mL fino al giorno 40 in topi umanizzati con C5. In alcuni casi, gli anticorpi anti-C5 bloccano l'emolisi di CP e AP fino al giorno 35 dopo la somministrazione a topi umanizzati con C5.

Gli anticorpi e i loro frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono competere per il legame specifico a C5 con un anticorpo o suo frammento di legame di antigene comprendente le CDR di una HCVR e le CDR di una LCVR, in cui HCVR e LCVR hanno ciascuna una sequenza amminoacidica selezionata dalle sequenze di HCVR e LCVR elencate nella Tabella 1.

Gli anticorpi e i loro frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono competere in modo incrociato per il legame a C5 con un anticorpo di riferimento o suo frammento di legame di antigene comprendente le CDR di una HCVR e le CDR di una LCVR, in cui HCVR e LCVR hanno ciascuna una sequenza amminoacidica selezionata dalle sequenze di HCVR e LCVR elencate nella Tabella 1.

Gli anticorpi e i loro frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono legarsi allo stesso epitopo di un anticorpo di riferimento o suo frammento di legame di antigene comprendente le CDR di una HCVR e le CDR di una LCVR, in cui HCVR e LCVR hanno ciascuna una sequenza amminoacidica selezionata dalle sequenze di HCVR e LCVR elencate nella Tabella 1.

Gli anticorpi anti-C5 e i loro frammenti di legame di

antigene descritti nella presente possono legarsi a uno o più residui amminoacidici compresi nella catena alfa e/o nella catena beta di C5. Gli anticorpi e i loro frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono legarsi a uno o più amminoacidi nella catena alfa di C5 e uno o più amminoacidi nella catena beta di C5. Gli anticorpi e i loro frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono legarsi a uno o più amminoacidi nelle catene alfa e beta di C5, in cui gli anticorpi non si legano al dominio di anafilatossina di C5a. Gli anticorpi anti-C5 descritti nella presente possono interagire con uno o più amminoacidi contenuti all'interno di C5 umano (SEQ ID NO: 359). Gli anticorpi anti-C5 descritti nella presente possono interagire con uno o più amminoacidi contenuti all'interno di C5 umano (SEQ ID NO: 359), in cui gli anticorpi non si legano al dominio di anafilatossina di C5a di C5. Gli anticorpi anti-C5 e i loro frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono interagire con una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da (a) amminoacidi da 591 a 599 della SEQ ID NO: 359; (b) amminoacidi da 593 a 599 della SEQ ID NO: 359; (c) amminoacidi da 775 a 787 della SEQ ID NO: 359; (d) amminoacidi da 775 a 794 della SEQ ID

NO: 359; e (e) amminoacidi da 779 a 787 della SEQ ID NO: 359. Gli anticorpi anti-C5 e i loro frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono interagire con uno o più amminoacidi contenuti all'interno della SEQ ID NO: 359, ad esempio, anticorpi anti-C5 e loro frammenti di legame di antigene che interagiscono con almeno 5 amminoacidi, almeno 10 amminoacidi o almeno 15 amminoacidi contenuti nella SEQ ID NO: 361. Gli anticorpi anti-C5 e i loro frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono interagire con uno o più amminoacidi contenuti all'interno della SEQ ID NO: 359, per esempio, anticorpi anti-C5 e loro frammenti di legame di antigene che interagiscono con almeno 5 amminoacidi contenuti all'interno della SEQ ID NO: 360. Gli anticorpi anti-C5 e i loro frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono interagire con almeno 5 amminoacidi contenuti all'interno delle SEQ ID NO: 360 e 361. Gli anticorpi anti-C5 e i loro frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono interagire con la sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 360 (corrispondente agli amminoacidi da 591 a 599 della SEQ ID NO: 359) e con la sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 361 (corrispondente agli amminoacidi da

775 a 794 della SEQ ID NO: 359).

L'anticorpo o suo frammento di legame di antigene descritto nella presente può legarsi specificamente a C5 in modo agonista, ovvero può potenziare o stimolare il legame e/o l'attività di C5; o l'anticorpo può legarsi specificamente a C5 in modo antagonista, ovvero può bloccare il legame e/o l'attività di C5.

Gli anticorpi e i loro frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono bloccare il legame di C5 alla convertasi C5. L'anticorpo o suo frammento di legame di antigene descritto nella presente può bloccare il legame di C5 alla convertasi C5 può legarsi su C5 allo stesso epitopo di convertasi C5 o può legarsi su C5 a un epitopo differente di convertasi C5. Gli anticorpi o i loro frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono bloccare il legame di C5 alla convertasi C5 di scimmia.

Gli anticorpi o i frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono essere bispecifici comprendenti una prima specificità di legame a un primo epitopo della proteina C5 e una seconda specificità di legame a un secondo epitopo della proteina C5 in cui il primo e il secondo epitopo sono

distinti e non sovrapposti.

Gli anticorpi e i frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono legarsi a C5a con una IC_{50} minore di 0,5nM. [025] L'anticorpo isolato o il suo frammento di legame di antigene descritto nella presente può avere una o più delle seguenti caratteristiche: (a) è un anticorpo monoclonale completamente umano; (b) si lega a C5 umano con una costante di dissociazione (K_D) minore di 0,9nM a 25°C, come misurata in un saggio di risonanza plasmonica di superficie; (c) si lega a C5 umano con una K_D minore di 0,3nM a 37°C, come misurata in un saggio di risonanza plasmonica di superficie; (d) si lega a C5 di scimmia con una K_D minore di 65nM, come misurata in un saggio di risonanza plasmonica di superficie; (e) si lega alla variante di C5 umano R885H (SEQ ID NO: 356) con una K_D minore di 0,5nM, come misurata in un saggio di risonanza plasmonica di superficie; (f) si lega alla variante di C5 umano R885C (SEQ ID NO: 357) con una K_D minore di 0,5nM, come misurata in un saggio di risonanza plasmonica di superficie; (g) blocca l'emolisi della via classica (CP) mediata da C5 umano di oltre il 95% e con IC_{50} minore di 6nM, come misurata in un saggio di emolisi di CP; (h) blocca l'emolisi della via alternativa

(AP) mediata da C5 umano di oltre il 70% e con IC_{50} minore di 165nM, come misurata in un saggio di emolisi di AP; (i) inibisce l'emolisi di CP mediata da C5 di scimmia verde africana con IC_{50} minore di 185nM, come misurata in un saggio di emolisi di CP; (j) inibisce l'emolisi di AP mediata da C5 di scimmia verde africana con IC_{50} minore di 235nM, come misurata in un saggio di emolisi di AP; (k) inibisce l'emolisi di CP mediata da C5 di scimmia cinomolgo con IC_{50} minore di 145nM, come misurata in un saggio di emolisi di CP; e (l) inibisce l'emolisi di AP mediata da C5 di scimmia cinomolgo con IC_{50} minore di 30nM, come misurata in un saggio di emolisi di AP.

L'anticorpo anti-C5 monoclonale ricombinante isolato o il suo frammento di legame di antigene descritto nella presente può avere una o più delle seguenti caratteristiche: (a) comprende un insieme di sei CDR comprendenti le sequenze amminoacidiche delle SEQ ID NO: 100-102-104-108-110-112; (b) si lega a C5 umano con una costante di dissociazione (K_D) minore di 0,2nM a 25°C, come misurata in un saggio di risonanza plasmonica di superficie; (c) si lega a C5 umano con una K_D minore di 0,3nM a 37°C, come misurata in un saggio di risonanza plasmonica di superficie; (d) si lega a una variante di C5 umano (R885H) con una K_D

minore di 0,4nM a 37°C, come misurata in un saggio di risonanza plasmonica di superficie; (e) inibisce l'emolisi mediata da via classica (CP) del siero umano con una IC₅₀ minore di 3nM; (f) inibisce l'emolisi mediata da via alternativa (AP) del siero umano con una IC₅₀ minore di 27nM; (g) inibisce l'emolisi mediata da CP del siero di scimmia con una IC₅₀ minore di 21nM; (g) inibisce l'emolisi mediata da AP di siero di scimmia con una IC₅₀ minore di 10nM; (h) ha un'emivita nel siero (t_{1/2}) maggiore di 10 giorni in topi C5-umanizzati; (i) ha una concentrazione nel siero maggiore di 10 µg/mL fino al giorno 40 dopo la somministrazione a topi C5-umanizzati; (j) blocca l'emolisi mediata da CP fino al giorno 50 in topi C5-umanizzati; e (k) si lega a uno o più amminoacidi compresi nella catena alfa e/o nella catena beta della SEQ ID NO: 359, in cui l'anticorpo non si lega al dominio di anafilatossina C5a di C5.

L'invenzione fornisce anche un metodo per produrre l'anticorpo o il suo frammento di legame di antigene descritti nella presente, in cui il metodo comprende coltivare una cellula ospite comprendente una o più molecole di acido nucleico che codificano HCVR o LCVR dell'anticorpo o del frammento di legame di antigene

dell'invenzione in condizioni che permettono la produzione dell'anticorpo o del frammento di legame di antigene, in cui le una o più molecole di acido nucleico che codificano HCVR e LCVR comprendono: una sequenza nucleotidica come esposto in SEQ ID NO: 99; una sequenza nucleotidica come esposto in SEQ ID NO: 101; una sequenza nucleotidica come esposto in SEQ ID NO: 103; una sequenza nucleotidica come esposto in SEQ ID NO: 107; una sequenza nucleotidica come esposto in SEQ ID NO: 109; e una sequenza nucleotidica come esposto in SEQ ID NO: 111.

L'invenzione fornisce anche un metodo in cui le una o più molecole di acido nucleico che codificano HCVR e LCVR comprendono una sequenza nucleotidica come esposto in SEQ ID NO: 97. L'invenzione fornisce anche un metodo in cui le una o più molecole di acido nucleico che codificano HCVR e LCVR comprendono una sequenza nucleotidica come esposto in SEQ ID NO: 105.

L'invenzione fornisce anche un metodo in cui le una o più molecole di acido nucleico che codificano HCVR e LCVR comprendono una sequenza nucleotidica come esposto in SEQ ID NO: 97 e una sequenza nucleotidica come esposto in SEQ ID NO: 105. L'invenzione fornisce anche un metodo in cui la cellula ospite è una cellula ovarica di criceto cinese (CHO).

In un secondo aspetto, nella presente sono descritte molecole di acido nucleico codificanti anticorpi anti-C5 o loro porzioni. Per esempio, le molecole di acido nucleico descritte nella presente possono codificare qualsiasi delle sequenze amminoacidiche di HCVR elencate nella Tabella 1; in alcuni casi la molecola di acido nucleico comprende una sequenza polinucleotidica selezionata da qualsiasi delle sequenze di acidi nucleici di HCVR elencate nella Tabella 2, o una sua sequenza sostanzialmente simile avente almeno il 90%, almeno il 95%, almeno il 98% o almeno il 99% di identità di sequenza con essa.

Le molecole di acido nucleico descritte nella presente possono codificare qualsiasi delle sequenze amminoacidiche di LCVR elencate nella Tabella 1; in certi casi la molecola di acido nucleico comprende una sequenza polinucleotidica selezionata da qualsiasi delle sequenze di acidi nucleici di LCVR elencate nella Tabella 2, o una sua sequenza sostanzialmente simile avente almeno il 90%, almeno il 95%, almeno il 98% o almeno il 99% di identità di sequenza con essa.

Le molecole di acidi nucleici descritte nella presente possono codificare sia una HCVR che una LCVR, in cui la HCVR comprende una sequenza

amminoacidica di una qualsiasi delle sequenze amminoacidiche di HCVR elencate nella Tabella 1, e in cui la LCVR comprende una sequenza amminoacidica di una qualsiasi delle sequenze amminoacidiche di LCVR elencate nella Tabella 1. In alcuni casi, la molecola di acido nucleico comprende una sequenza polinucleotidica selezionata da qualsiasi delle sequenze di acidi nucleici di HCVR elencate nella Tabella 2, o una sua sequenza sostanzialmente simile avente almeno il 90%, almeno il 95%, almeno il 98% o almeno il 99% di identità di sequenza con essa, e una sequenza polinucleotidica selezionata da qualsiasi delle sequenze di acidi nucleici di LCVR elencate nella Tabella 1, o una sua sequenza sostanzialmente simile avente almeno il 90%, almeno il 95%, almeno il 98% o almeno il 99% di identità di sequenza con essa. In alcuni casi, la molecola di acido nucleico codifica una HCVR e LCVR, in cui HCVR e LCVR sono entrambe derivate dallo stesso anticorpo anti-C5 elencato nella Tabella 1.

In un aspetto correlato, la presente divulgazione fornisce vettori di espressione ricombinanti comprendenti una molecola polinucleotidica descritta nella presente. Il vettore è in grado di esprimere un polipeptide comprendente una regione variabile di

catena pesante o leggera di un anticorpo anti-C5. Nella portata della presente invenzione sono anche inclusi metodi per produrre gli anticorpi o le loro porzioni coltivando cellule ospite in cui tali vettori sono stati introdotti, in condizioni che permettono la produzione degli anticorpi o dei frammenti di anticorpi, e recuperando gli anticorpi e i frammenti di anticorpi così prodotti.

Qualsiasi riferimento nella descrizione a metodi di trattamento si riferisce ai composti, alle composizioni farmaceutiche e ai medicinali della presente invenzione per l'uso in un metodo per il trattamento del corpo umano (o animale) mediante terapia. [033] In certi aspetti, la divulgazione si riferisce all'anticorpo anti-C5 o suo frammento di legame di antigene dell'invenzione per l'uso in metodi per prevenire, trattare o migliorare almeno un sintomo di sindrome uremica emolitica atipica (aHUS), il metodo comprendendo somministrare una quantità terapeuticamente efficace di un anticorpo anti-C5 o suo frammento di legame di antigene dell'invenzione a un soggetto che ne ha bisogno. In certi aspetti, la presente divulgazione si riferisce all'anticorpo anti-C5 o suo frammento di legame di antigene dell'invenzione per l'uso in metodi per migliorare o

ridurre la gravità di almeno un sintomo o indicazione di emoglobinuria parossistica notturna (PNH) in un soggetto somministrando un anticorpo anti-C5 dell'invenzione. In alcuni aspetti, l'anticorpo o suo frammento di legame di antigene può essere somministrato in modo profilattico o terapeutico a un soggetto che ha o è a rischio di avere una malattia o disturbo associato a C5. In certi aspetti, l'anticorpo o suo frammento di legame di antigene è somministrato in combinazione con un secondo agente terapeutico al soggetto che ne ha bisogno. Il secondo agente terapeutico può essere selezionato dal gruppo costituito da un farmaco antinfiammatorio (come corticosteroidi e farmaci antinfiammatori non steroidei), un anticorpo differente verso la proteina C5, un integratore alimentare come antiossidanti e qualsiasi altro farmaco o terapia nota nell'arte. In certe forme di realizzazione, il secondo agente terapeutico può essere un agente che aiuta a contrastare o ridurre qualsiasi possibile uno o più effetti collaterali associati a un anticorpo o suo frammento di legame di antigene dell'invenzione, se tali uno o più effetti collaterali dovessero verificarsi. L'anticorpo o suo frammento può essere somministrato per via sottocutanea, intravenosa,

intradermica, intraperitoneale, orale o intramuscolare. L'anticorpo o suo frammento può essere somministrato a una dose da circa 0,1 mg/kg di peso corporeo a circa 100 mg/kg di peso corporeo del soggetto. In certe forme di realizzazione, un anticorpo della presente invenzione può essere somministrato a una o più dosi comprendenti tra 50mg e 600mg.

Altre forme di realizzazione diventano evidenti da un esame della descrizione dettagliata che segue.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

FIG. 1 mostra l'inibizione dei livelli di C5a da parte dell'anticorpo anti-C5 H4H12166P in modo dose-dipendente, come determinato mediante ELISA (descritta nell'Esempio 9 nella presente).

FIG. 2 mostra la concentrazione nel siero totale rispetto al tempo dopo una singola iniezione intravenosa di 15 mg/kg di H4H12166P, H4H12161P o Comparatore 2 a scimmie cinomolgo maschio (descritta nell'Esempio 10 nella presente). I profili concentrazione-tempo sono stati tracciati attraverso il primo risultato dopo la dose al di sotto del limite di quantificazione (BLQ), se applicabile, che è stato imputato come LLOQ/2. Ogni punto di dati rappresenta la media (\pm SD) (n = 4 animali/gruppo); le

concentrazioni considerate influenzate da ADA sono state escluse da 1 animale nel gruppo H4H12166P e 1 animale nel gruppo H4H12161P a partire dal giorno 36 e dal giorno 29, rispettivamente. LLOQ = Limite inferiore di quantificazione

FIG. 3 mostra la percentuale di emolisi rispetto al tempo nei saggi della (A) Via classica e (B) Via alternativa dei globuli rossi ex vivo dopo una singola iniezione intravenosa di H4H12166P, H4H12161P o Comparatore 2 a scimmie cinomolgo maschio. La % di emolisi, calcolata come rapporto tra lisi sperimentale e lisi massima con % di lisi di fondo sottratta da entrambi i valori, è correlata alla quantità di C5 inibita dal particolare anticorpo anti-C5 presente nel siero a un dato tempo. Ogni punto di dati rappresenta la media (\pm SD).

FIG. 4 mostra i profili di concentrazione nel siero totale rispetto al tempo di anticorpi anti-C5 selezionati in topi umanizzati per C5 (descritti nell'Esempio 11 nella presente). Ai topi C5 umanizzati è stata somministrata una singola dose sottocutanea di 15 mg/kg di H4H12166P, Comparatore 1 o Comparatore 2. Ciascun punto di dati rappresenta la media \pm s.e.m. (n =4-5 ciascuno). Le concentrazioni di anticorpi nei sieri sono state monitorate 1, 10,

20, 30 e 40 giorni dopo l'iniezione usando un ELISA a sandwich.

FIG. 5 mostra la percentuale di emolisi rispetto al tempo in un saggio di emolisi della via classica del complemento ex vivo di anticorpi anti-C5 selezionati in topi umanizzati per C5. Ai topi C5 umanizzati è stata somministrata una singola dose sottocutanea di 15 mg/kg di H4H12166P, Comparatore 1 o Comparatore 2. Ciascun punto di dati rappresenta la media \pm s.e.m. (n =4-5 ciascuno). L'emolisi percentuale nel siero è stata monitorata alla pre-dose, 10, 20, 30, 40 e 50 giorni dopo l'iniezione. La % di emolisi, calcolata come rapporto tra lisi sperimentale e lisi massima con % di lisi di fondo sottratta da entrambi i valori, è correlata alla quantità di C5 inibita dal particolare anticorpo anti-C5 presente nel siero a un dato tempo.

FIG. 6 mostra i profili di concentrazione nel siero totale rispetto al tempo di anticorpi anti-C5 selezionati in topi umanizzati per C5 (descritti nell'Esempio 11 nella presente). Ai topi è stata somministrata una singola dose sottocutanea di 15 mg/kg di H4H12166P, H4H12161P, Comparatore 1 o controllo di isotipo IgG4^P. Ciascun punto di dati rappresenta la media \pm s.e.m. (n = 5 ciascuno). I

livelli di anticorpi nei sieri sono stati monitorati 6 ore, 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 21, 30, 45 e 59 giorni dopo l'iniezione usando un ELISA a sandwich.

FIG. 7 è un grafico che mostra i punteggi della tomografia a coerenza ottica (OCT) nei topi trattati con controllo di isotipo o con anticorpo anti-C5 M1M17628N a 10 mg/kg o 50 mg/kg (descritti nell'Esempio 14 nella presente). **** $p < 0,0001$, ANOVA a due vie trattamento con anticorpo anti-C5 a 50 mg/kg rispetto a nessun trattamento o trattamento con controllo di isotipo.

FIG. 8 mostra l'inibizione dell'emolisi della via classica da parte dell'anticorpo anti-C5 M1M17628N in assenza di C3 (A); e in presenza di 80 $\mu\text{g/mL}$ di C3 umano (B) (descritta nell'Esempio 14 nella presente).

FIG. 9 mostra la conta dei cluster di cellule nei topi C5 umanizzati trattati con controllo di isotipo o con anticorpo anti-C5 umano H4H12170P a 10 mg/kg o 50 mg/kg (descritta nell'Esempio 15 nella presente). $n=8-12$ occhi per ciascun gruppo.

FIG. 10 è un grafico che mostra i punteggi OCT nei topi C5 umanizzati trattati con controllo di isotipo o con anticorpo anti-C5 umano H4H12170P a 10 mg/kg o 50 mg/kg (descritto nell'Esempio 15 nella presente). $n=8-12$ occhi per ciascun gruppo

FIG. 11 è un grafico che mostra i punteggi OCT in topi C5 umanizzati trattati con controllo di isotipo, anticorpo anti-C5 umano H4H12166P a 3 mg/kg o 10 mg/kg, o Comparatore 2 a 10 mg/kg. n=6-12 occhi per ciascun gruppo (descritto nell'Esempio 15 nella presente).

FIG. 12 mostra la conta dei cluster di cellule nei topi C5 umanizzati trattati con controllo di isotipo, anticorpo anti-C5 umano H4H12166P a 3 mg/kg o 10 mg/kg, o Comparatore 2 a 10 mg/kg. n=6-12 occhi per ciascun gruppo (descritta nell'Esempio 15 nella presente).

FIG. 13 è una curva di sopravvivenza di topi NZBWF1 trattati con controllo di isotipo o con anticorpi anti-C5 M1M17628N o M1M17627N (descritta nell'Esempio 17 nella presente).

FIG. 14 mostra i livelli di (A) albumina urinaria e (B) albumina urinaria normalizzata alla creatinina urinaria nei topi NZBWF1 trattati con controllo di isotipo o con anticorpi anti-C5 M1M17628N o M1M17627N (descritti nell'Esempio 17 nella presente).

FIG. 15 mostra i livelli di azoto ureico nel sangue nei topi NZBWF1 trattati con controllo di isotipo o con anticorpi anti-C5 M1M17628N o M1M17627N (descritti nell'Esempio 17 nella presente).

FIG. 16 è un grafico che mostra l'inibizione della citotossicità anticorpo-dipendente di astrociti da parte di anticorpi anti-C5 H4H12166P, H4H12170P, Comparatore 1 e Comparatore 2, come descritto nell'Esempio 18.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

Prima di descrivere i presenti metodi, resta inteso che questa invenzione non è limitata a particolari metodi, e alle condizioni sperimentali descritte, in quanto tali metodi e condizioni possono variare. Si deve anche comprendere che la terminologia usata nella presente ha lo scopo di descrivere solo particolari forme di realizzazione, e non intende essere limitativa, poiché la portata della presente invenzione è limitata solo dalle rivendicazioni allegate.

Se non altrimenti definiti, i termini tecnici e scientifici usati nella presente hanno lo stesso significato comunemente inteso da un esperto del ramo al quale questa invenzione appartiene. Sebbene qualsiasi metodo e materiale simile o equivalente a quelli descritti nella presente possa essere usato nella pratica o nel test della presente invenzione, vengono ora descritti i metodi e materiali preferiti.

Definizioni

Il termine "C5", chiamato anche "componente del complemento 5" o "fattore del complemento 5" si riferisce alla proteina sierica della cascata del complemento. La proteina C5 è una proteina da 1676 amminoacidi che comprende due catene, alfa e beta. La proteina rappresenta il punto di convergenza per tre vie di attivazione del complemento: via classica, via alternativa e via della lectina legante il mannosio. La sequenza amminoacidica della proteina C5 di lunghezza intera è esemplificata dalla sequenza amminoacidica fornita in GenBank come numero di accesso NP_001726.2 (SEQ ID NO: 355). Il termine "C5" include la proteina C5 ricombinante o un suo frammento. Il termine comprende anche proteina C5 o un suo frammento accoppiato, per esempio, a tag istidina, Fc di topo o umano, o una sequenza di segnali come ROR1. Per esempio, il termine include sequenze esemplificate dalla sequenza mostrata nella SEQ ID NO: 356 o 357, comprendente un tag istidina al C-terminale, accoppiato ai residui amminoacidici 19 - 1676 della proteina C5 di lunghezza intera. Il termine include anche proteine varianti che comprendono un tag istidina al C-terminale, accoppiato ai residui amminoacidici 19 - 1676 della proteina C5 di lunghezza intera con un cambiamento

R885H o un cambiamento R885C.

Il termine "anticorpo", come usato nella presente, intende riferirsi a molecole di immunoglobulina costituite da quattro catene polipeptidiche, due catene pesanti (H) e due catene leggere (L) interconnesse mediante legami disolfuro (ovvero, "molecole di anticorpo complete"), così come loro multimeri (per esempio IgM) o loro frammenti di legame di antigene. Ciascuna catena pesante è costituita da una regione variabile di catena pesante ("HCVR" o "V_H") e da una regione costante di catena pesante (costituita dai domini C_{H1}, C_{H2} e C_{H3}). Ciascuna catena leggera è costituita da una regione variabile di catena leggera ("LCVR o "V_L") e da una regione costante di catena leggera (C_L). Le regioni V_H e V_L possono essere ulteriormente suddivise in regioni di ipervariabilità, denominate regioni di determinazione di complementarità (CDR), intervallate con regioni che sono più conservate, denominate regioni cornice (FR). Ciascuna V_H e V_L è costituita da tre CDR e quattro FR, disposte dall'ammino-terminale al carbossi-terminale nel seguente ordine: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Le FR dell'anticorpo (o suo frammento di legame di antigene) possono essere identiche alle sequenze

germinali umane, o possono essere modificate in modo naturale o artificiale. Una sequenza consenso di amminoacidi può essere definita in base all'analisi lato a lato di due o più CDR.

La sostituzione di uno o più residui di CDR o l'omissione di una o più CDR è anche possibile. Anticorpi sono stati descritti nella letteratura scientifica in cui una o due CDR possono essere dispensate per il legame. Padlan *et al.* (1995 FASEB J. 9:133-139) ha analizzato le regioni di contatto tra gli anticorpi e i loro antigeni, in base alle strutture cristalline pubblicate, e ha concluso che solo circa da un quinto a un terzo dei residui della CDR effettivamente entra in contatto con l'antigene. Padlan ha anche trovato molti anticorpi in cui una o due CDR non avevano amminoacidi a contatto con un antigene (si veda anche, Vajdos *et al.* 2002 J Mol Biol 320:415-428).

I residui della CDR che non sono a contatto con l'antigene possono essere identificati sulla base di studi precedenti (per esempio i residui H60-H65 in CDRH2 spesso non sono richiesti), dalle regioni di CDR di Kabat che si trovano al di fuori delle CDR di Chothia, mediante modellazione molecolare e/o empiricamente. Se una CDR o uno o più suoi residui

sono omessi, di solito sono sostituiti con un amminoacido che occupa la posizione corrispondente in un'altra sequenza di anticorpo umano o un consenso di tali sequenze. Le posizioni per la sostituzione all'interno di CDR e gli amminoacidi da sostituire possono anche essere selezionate empiricamente. Le sostituzioni empiriche possono essere sostituzioni conservative o non conservative.

Gli anticorpi monoclonali anti-C5 completamente umani divulgati nella presente possono comprendere una o più sostituzioni, inserzioni e/o delezioni di amminoacidi nelle regioni cornice e/o CDR dei domini variabili di catena pesante e leggera rispetto alle corrispondenti sequenze di linea germinale. Tali mutazioni possono essere prontamente accertate mediante il confronto delle sequenze amminoacidiche divulgate nella presente con le sequenze di linea germinale disponibili da, per esempio, database pubblici di sequenze di anticorpi. Nella presente sono descritti anticorpi, e loro frammenti di legame di antigene, i quali sono derivati da qualsiasi delle sequenze amminoacidiche divulgate nella presente, in cui uno o più amminoacidi all'interno di una o più regioni cornice e/o CDR sono mutati nei corrispondenti uno o più residui della sequenza di

linea germinale dalla quale l'anticorpo è stato derivato, o nei corrispondenti uno o più residui di un'altra sequenza di linea germinale umana, o in una sostituzione di amminoacidi conservativa dei corrispondenti uno o più residui di linea germinale (tali variazioni di sequenza sono indicate nella presente collettivamente come "mutazioni di linea germinale"). Un esperto del ramo, partendo dalle sequenze di regione variabile di catena pesante e leggera divulgate nella presente, può facilmente produrre numerosi anticorpi e frammenti leganti l'antigene i quali comprendono una o più mutazioni singole o loro combinazioni. In certe forme di realizzazione, tutti i residui di cornice e/o di CDR all'interno dei domini V_H e/o V_L sono retro-mutati nei residui trovati nella sequenza di linea germinale originale da cui l'anticorpo è stato derivato. In altre forme di realizzazione, solo certi residui sono retro-mutati nella sequenza di linea germinale originale, *per esempio*, solo i residui mutati trovati all'interno dei primi 8 amminoacidi di FR1 o all'interno degli ultimi 8 amminoacidi di FR4, o solo i residui mutati trovati all'interno di CDR1, CDR2 e CDR3. In altre forme di realizzazione, uno o più dei residui della cornice e/o della CDR sono mutati nei

corrispondenti uno o più residui di una sequenza di linea germinale differente (ovvero, una sequenza di linea germinale che è differente dalla sequenza di linea germinale dal quale l'anticorpo è stato originariamente derivato). Inoltre, gli anticorpi descritti nella presente possono contenere qualsiasi combinazione di due o più mutazioni di linea germinale all'interno delle regioni cornice e/o CDR, per esempio, in cui certi singoli residui sono mutati nei residui corrispondenti di una particolare sequenza di linea germinale mentre certi altri residui che differiscono dalla sequenza di linea germinale originale sono mantenuti o sono mutati nei residui corrispondenti di una sequenza di linea germinale differente. Una volta ottenuti, gli anticorpi e i frammenti di legame di antigene che contengono una o più mutazioni di linea germinale possono essere facilmente testati per una o più proprietà desiderate, come specificità di legame potenziata, affinità di legame aumentata, proprietà biologiche di antagonista o agonista migliorate o potenziate (in base al caso), immunogenicità ridotta, ecc.

Gli anticorpi monoclonali anti-C5 completamente umani descritti nella presente possono comprendere varianti

di qualsiasi delle sequenze amminoacidiche di HCVR, LCVR e/o CDR divulgate nella presente aventi una o più sostituzioni conservative. Per esempio, anticorpi anti-C5 aventi sequenze amminoacidiche di HCVR, LCVR, e/o CDR con, *per esempio*, 10 o meno, 8 o meno, 6 o meno, 4 o meno, ecc. sostituzioni amminoacidiche conservative rispetto a qualsiasi delle sequenze amminoacidiche di HCVR, LCVR, e/o CDR divulgate nella presente.

Il termine "anticorpo umano", come usato nella presente, è inteso includere anticorpi aventi regioni variabili e costanti derivate da sequenze di immunoglobulina di linea germinale umana. I mAb umani dell'invenzione possono includere residui amminoacidici non codificati dalle sequenze di immunoglobulina di linea germinale umana (*per esempio*, mutazioni introdotte mediante mutagenesi casuale o sito-specifica *in vitro* o mediante mutazione somatica *in vivo*), per esempio nelle CDR e in particolare nella CDR3. Tuttavia, Il termine "anticorpo umano", come usato nella presente, non è inteso includere gli mAb in cui le sequenze delle CDR derivate dalla linea germinale di un'altra specie di mammifero (*per esempio*, topo), sono state innestate sulle sequenze di FR umane. Il termine include

anticorpi prodotti in modo ricombinante in un mammifero non umano, o in cellule di un mammifero non umano. Il termine non è inteso includere anticorpi isolati da o generati in un soggetto umano.

Il termine "ricombinante", come usato nella presente, si riferisce a anticorpi o loro frammenti di legame di antigene dell'invenzione creati, espressi, isolati o ottenuti mediante tecnologie o metodi noti nell'arte come tecnologia di DNA ricombinante che includono, per esempio, splicing del DNA ed espressione transgenica. Il termine si riferisce a anticorpi espressi in un mammifero non umano (inclusi mammiferi non umani transgenici, per esempio, topi transgenici) o una cellula (per esempio, cellule CHO) o isolati da una libreria combinatoria di anticorpi umani ricombinanti.

Il termine "si lega specificamente", o "si lega specificamente a", o simili, significa che un anticorpo o suo frammento di legame di antigene forma un complesso con un antigene che è relativamente stabile a condizioni fisiologiche. Il legame specifico può essere caratterizzato da una costante di dissociazione di equilibrio di almeno circa 1×10^{-8} M o meno (per esempio, una K_D più piccola indica un legame più stretto). I metodi per determinare se due

molecole si legano specificamente sono ben noti nell'arte e includono, per esempio, dialisi di equilibrio, risonanza plasmonica di superficie, e simili. Come descritto nella presente, sono stati identificati anticorpi mediante risonanza plasmonica di superficie, per esempio, BIACORE™, che si legano specificamente a C5. Inoltre, anticorpi multi-specifici che si legano a un dominio in C5 e a uno o più antigeni aggiuntivi o un bi-specifico che si lega a due differenti regioni di C5 sono non di meno considerati anticorpi che "si legano specificamente a", come usati nella presente.

Il termine anticorpo "a elevata affinità" si riferisce a quegli mAb aventi un'affinità di legame a C5, espressa come K_D , di almeno 10^{-8} M; preferibilmente 10^{-9} M; più preferibilmente 10^{-10} M, ancora più preferibilmente 10^{-11} M, ancora più preferibilmente 10^{-12} M, come misurata mediante risonanza plasmonica di superficie, per esempio, BIACORE™ o ELISA di affinità in soluzione.

Con il termine "tasso di rallentamento", "Koff" o "kd" si intende un anticorpo che si dissocia da C5, con una costante di velocità di $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o meno, preferibilmente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o meno, come determinato mediante risonanza plasmonica di superficie, per

esempio, BIACORE™.

I termini "porzione di legame di antigene" di un anticorpo, "frammento di legame di antigene" di un anticorpo, e simili, come usati nella presente, includono qualsiasi polipeptide o glicoproteina presente in natura, ottenibile enzimaticamente, di sintesi o geneticamente ingegnerizzata che si lega specificamente a un antigene per formare un complesso. I termini "frammento di legame di antigene" di un anticorpo, o "frammento di anticorpo", come usati nella presente, si riferiscono a uno o più frammenti di un anticorpo che mantengono la capacità di legarsi alla proteina C5.

In forme di realizzazione specifiche, l'anticorpo o i frammenti di anticorpo descritti nella presente possono essere coniugati a un gruppo funzionale come un ligando o un gruppo funzionale terapeutico ("immunoconiugato"), un secondo anticorpo anti-C5, o qualsiasi altro gruppo funzionale terapeutico utile per trattare una malattia o un disturbo associato a C5.

Un "anticorpo isolato", come usato nella presente, è inteso riferirsi a un anticorpo che è sostanzialmente privo di altri anticorpi (Ab) aventi differenti specificità di antigene (*per esempio*, un anticorpo

isolato che si lega specificamente a C5, o un suo frammento, è sostanzialmente privo di Ab che si legano specificamente ad antigeni diversi da C5.

Un "anticorpo bloccante" o un "anticorpo neutralizzante", come usato nella presente (o un "anticorpo che neutralizza l'attività di C5" o "anticorpo antagonista"), è inteso riferirsi a un anticorpo il cui legame a C5 causa l'inibizione di almeno un'attività biologica di C5. Per esempio, un anticorpo descritto nel presente documento può prevenire o bloccare l'emolisi mediata dal complemento mediante la via classica o la via alternativa.

Il termine "risonanza plasmonica di superficie", come usato nella presente, si riferisce a un fenomeno ottico che consente l'analisi di interazioni biomolecolari in tempo reale mediante il rilevamento di alterazioni nelle concentrazioni di proteina all'interno di una matrice di biosensore, per esempio usando il sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.).

Il termine " K_D ", come usato nella presente, è inteso riferirsi alla costante di dissociazione all'equilibrio di una particolare interazione anticorpo-antigene.

Il termine "epitopo" si riferisce a un determinante antigenico che interagisce con un sito di legame di un antigene specifico nella regione variabile di una molecola di anticorpo noto come paratopo. Un singolo antigene può avere più di un epitopo. Pertanto, anticorpi differenti possono legarsi a differenti aree su un antigene e possono avere differenti effetti biologici. Il termine "epitopo" si riferisce anche a un sito su un antigene a cui rispondono le cellule B e/o T. Si riferisce anche a una regione di un antigene che è legato da un anticorpo. Gli epitopi possono essere definiti come strutturali o funzionali. Gli epitopi funzionali sono generalmente un sottoinsieme degli epitopi strutturali e hanno quei residui che contribuiscono direttamente all'affinità dell'interazione. Gli epitopi possono anche essere conformazionali, cioè composti da amminoacidi non lineari. In certe forme di realizzazione, gli epitopi possono includere determinanti che sono raggruppamenti di superficie chimicamente attivi di molecole come amminoacidi, catene laterali di zucchero, gruppi fosforile, o gruppi solfonile, e, in certe forme di realizzazione, possono avere specifiche caratteristiche strutturali tridimensionali, e/o specifiche caratteristiche di

carica.

Il termine "competete in modo incrociato", come usato nella presente, indica che un anticorpo o suo frammento di legame di antigene si lega a un antigene e inibisce o blocca il legame di un altro anticorpo o suo frammento di legame di antigene. Il termine include anche la competizione tra due anticorpi in entrambi gli orientamenti, ovvero un primo anticorpo che si lega e blocca il legame del secondo anticorpo e viceversa. In certe forme di realizzazione, il primo anticorpo e il secondo anticorpo possono legarsi allo stesso epitopo. In alternativa, il primo e il secondo anticorpo possono legarsi a epitopi differenti, ma sovrapposti in modo tale che il legame di uno inibisca o blocchi il legame del secondo anticorpo, *per esempio, tramite un impedimento sterico*. La competizione incrociata tra anticorpi può essere misurata mediante metodi noti nell'arte, per esempio, mediante un saggio di interferometria a biostrato senza etichetta in tempo reale. La competizione incrociata tra due anticorpi può essere espressa come il legame del secondo anticorpo che è inferiore al segnale di fondo a causa del legame self-self (in cui il primo e il secondo anticorpo sono lo stesso anticorpo). La competizione incrociata

tra 2 anticorpi può essere espressa, per esempio, come % di legame del secondo anticorpo che è minore del legame di sfondo self-self al basale (in cui il primo e il secondo anticorpo sono lo stesso anticorpo).

Il termine "identità sostanziale" o "sostanzialmente identico", quando si fa riferimento a un acido nucleico o suo frammento, indica che, quando allineato in modo ottimale con le inserzioni o delezioni nucleotidiche appropriate con un altro acido nucleico (o suo filamento complementare), c'è identità di sequenza nucleotidica in almeno circa il 90%, e più preferibilmente almeno circa il 95%, il 96%, il 97%, il 98% o il 99% delle basi nucleotidiche, misurata mediante qualsiasi algoritmo ben noto di identità di sequenza, come FASTA, BLAST o GAP, come discusso di seguito. Una molecola di acido nucleico avente una sostanziale identità con una molecola di acido nucleico di riferimento può, in alcuni casi, codificare un polipeptide avente la stessa o sostanzialmente simile sequenza amminoacidica del polipeptide codificato dalla molecola di acido nucleico di riferimento.

Come applicato ai polipeptidi, il termine "sostanziale similarità" o "sostanzialmente simile"

significa che due sequenze peptidiche, quando allineate in modo ottimale, come mediante i programmi GAP o BESTFIT usando pesi di gap di default, condividono almeno il 90% di identità di sequenza, ancora più preferibilmente almeno il 95%, il 98% o il 99% di identità di sequenza. Preferibilmente, le posizioni dei residui le quali non sono identiche differiscono per sostituzioni conservative di amminoacidi. Una "sostituzione conservativa di amminoacidi" è una nella quale un residuo amminoacidico è sostituito con un altro residuo di amminoacidico avente una catena laterale (gruppo R) con proprietà chimiche simili (*per esempio*, carica o idrofobicità). In generale, una sostituzione di amminoacidi conservativa non modifica sostanzialmente le proprietà funzionali di una proteina. Nei casi in cui due o più sequenze di amminoacidi differiscono tra loro per sostituzioni conservative, la percentuale o il grado di similarità può essere regolato verso l'alto per correggere la natura conservativa della sostituzione. Mezzi per effettuare questa regolazione sono ben noti agli esperti del ramo. Si veda, *per esempio*, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Esempi di gruppi di amminoacidi che hanno catene laterali con proprietà

chimiche simili includono 1) catene laterali alifatiche: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) catene laterali alifatico-ossidriliche: serina e treonina; 3) catene laterali contenenti ammidi: asparagina e glutammina; 4) catene laterali aromatiche: fenilalanina, tirosina e triptofano; 5) catene laterali basiche: lisina, arginina e istidina; 6) catene laterali acide: aspartato e glutammato e 7) catene laterali contenenti zolfo: cisteina e metionina. I gruppi preferiti di sostituzioni conservative di amminoacidi sono: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina, arginina, alanina-valina glutammato e aspartato e asparagina-glutammina. In alternativa, una sostituzione conservativa è qualsiasi cambiamento avente un valore positivo nella matrice di log-probabilità PAM250 descritta in Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-45. Una sostituzione "moderatamente conservativa" è qualsiasi cambiamento avente un valore non negativo nella matrice di log-probabilità PAM250.

La similarità di sequenza per i polipeptidi viene tipicamente misurata usando un software di analisi di sequenza. Il software di analisi delle proteine mette a confronto sequenze simili usando misure di

similarità assegnate a varie sostituzioni, delezioni e altre modifiche, incluse le sostituzioni conservative di amminoacidi. Per esempio, il software GCG contiene programmi come GAP e BESTFIT i quali possono essere usati con i parametri di default per determinare l'omologia di sequenza o l'identità di sequenza tra polipeptidi strettamente correlati, come polipeptidi omologhi da specie differenti di organismi o tra una proteina di tipo selvatico e una sua muteina. Si veda, *per esempio*, GCG Versione 6.1. Le sequenze polipeptidiche anche possono essere confrontate usando FASTA con i parametri di default o consigliati, un programma in GCG versione 6.1. FASTA (*per esempio*, FASTA2 e FASTA3) fornisce allineamenti e l'identità di sequenza percentuale delle regioni della migliore sovrapposizione tra le sequenze di domanda e di ricerca (Pearson (2000) *supra*). Un altro algoritmo preferito quando si confronta una sequenza con un database contenente un gran numero di sequenze provenienti da diversi organismi è il programma per computer BLAST, in particolare BLASTP o TBLASTN, usando parametri predefiniti. Si vedano, *per esempio*, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 e (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Con l'espressione "quantità terapeuticamente

efficace" si intende una quantità che produce l'effetto desiderato per cui viene somministrata. La quantità esatta dipende dallo scopo del trattamento ed è verificabile da un esperto del ramo usando tecniche note (si veda, per esempio, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Come usato nella presente, il termine "soggetto" si riferisce a un animale, preferibilmente un mammifero, più preferibilmente un umano, che necessita di miglioramento, prevenzione e/o trattamento di una malattia o disturbo associato a C5 come la sindrome emolitica uremica atipica (aHUS) o l'emoglobinuria parossistica notturna (PNH). Il termine include soggetti umani che hanno o sono a rischio di avere una tale malattia o disturbo.

Come usati nella presente, i termini "trattare", "trattando" o "trattamento" si riferiscono alla riduzione o al miglioramento della gravità di almeno un sintomo o indicazione di una malattia o disturbo associato a C5 a causa della somministrazione di un agente terapeutico come un anticorpo a un soggetto che ne ha bisogno. I termini includono l'inibizione della progressione della malattia o del peggioramento di un sintomo/indicazione. I termini includono anche

una prognosi positiva della malattia, vale a dire che il soggetto può essere privo di malattia o può avere una malattia ridotta dopo la somministrazione di un agente terapeutico come un anticorpo. L'agente terapeutico può essere somministrato a una dose terapeutica al soggetto.

I termini "prevenire", "prevenendo" o "prevenzione" si riferiscono all'inibizione della manifestazione di una malattia o disturbo associato a C5 o di qualsiasi sintomo o indicazione di tale malattia o disturbo dopo la somministrazione di un anticorpo descritto nella presente.

Frammenti di legame di antigene di anticorpi

A meno che non sia specificamente indicato il contrario, il termine "anticorpo", come usato nella presente, deve essere inteso comprendere le molecole di anticorpo comprendenti due catene pesanti di immunoglobulina e due catene leggere di immunoglobulina (ovvero, "molecole di anticorpi complete"), così come loro frammenti di legame di antigene. I termini "porzione di legame di antigene" di un anticorpo, "frammento di legame di antigene" di un anticorpo, e simili, come usati nella presente, includono qualsiasi polipeptide o glicoproteina presente in natura, ottenibile enzimaticamente, di

sintesi o geneticamente ingegnerizzata che si lega specificamente a un antigene per formare un complesso. I termini " frammento di legame di antigene " di un anticorpo, o " frammento di anticorpo ", come usati nella presente, si riferiscono a uno o più frammenti di un anticorpo che mantengono la capacità di legarsi specificamente alla proteina C5. Un frammento di anticorpo può includere un frammento Fab, un frammento $F(ab')_2$, un frammento Fv, un frammento dAb, un frammento contenente una CDR, o una CDR isolata. In certe forme di realizzazione, il termine " frammento di legame di antigene " si riferisce a un frammento di polipeptide di una molecola di legame di antigene multi-specifica. I frammenti di legame di antigene di un anticorpo possono essere derivati, *per esempio*, da molecole di anticorpi completi usando qualsiasi tecnica standard idonea come tecniche di digestione proteolitica o di ingegneria genetica ricombinante che implicano la manipolazione e l'espressione di DNA che codifica domini variabili e facoltativamente costanti di anticorpi. Tale DNA è noto e/o è facilmente disponibile da, *per esempio*, fonti commerciali, librerie di DNA (incluse, *per esempio*, librerie fago-anticorpo), o può essere sintetizzato. Il DNA può

essere sequenziato e manipolato chimicamente o mediante l'uso di tecniche di biologia molecolare, per esempio, per disporre uno o più domini variabili e/o costanti in una opportuna configurazione, o per introdurre codoni, creare residui di cisteina, modificare, aggiungere o sottoporre a delezione amminoacidi, ecc.

Esempi non limitativi di frammenti di legame di antigene includono: (i) frammenti Fab; (ii) frammenti $F(ab')_2$, (iii) frammenti Fd; (iv) frammenti Fv; (v) molecole Fv a singola catena (scFv); (iv) frammenti dAb; e (vii) unità di riconoscimento minimale costituite dai residui amminoacidici che mimano la regione ipervariabile di un anticorpo (*per esempio*, una regione di determinazione di complementarità (CDR) isolata come un peptide CDR3), o un peptide FR3-CDR3-FR4 limitato. Altre molecole ingegnerizzate, come anticorpi di dominio-specifico, anticorpi a singolo dominio, anticorpi con dominio deleto, anticorpi chimerici, anticorpi CDR-innestati, diabody, triabody, tetrabody, minibody, nanobody (*per esempio*, nanobody monovalenti, nanobody bivalenti, ecc.), immunofarmaci piccoli modulari (SMIP), domini IgNAR variabili di squalo, sono anche incluse all'interno dell'espressione "frammento di legame di

antigene", come usato nella presente.

Un frammento di legame di antigene di un anticorpo comprende tipicamente almeno un dominio variabile. Il dominio variabile può essere di qualsiasi dimensione o composizione amminoacidica e in generale comprende almeno una CDR, la quale è adiacente a o in cornice con una o più sequenze cornice. Nei frammenti di legame di antigene aventi un dominio V_H associato a un dominio V_L , i domini V_H e V_L possono essere situati l'uno rispetto all'altro in qualsiasi disposizione idonea. Per esempio, la regione variabile può essere dimerica e contenere dimeri $V_H - V_H$, $V_H - V_L$ o $V_L - V_L$. In alternativa, il frammento di legame di antigene di un anticorpo può contenere un dominio V_H o V_L monomero.

In certe forme di realizzazione, un frammento di legame di antigene di un anticorpo può contenere almeno un dominio variabile collegato covalentemente ad almeno un dominio costante. Configurazioni esemplificative, non limitative di domini variabili e costanti che possono essere trovate all'interno di un frammento di legame di antigene di un anticorpo della presente invenzione includono: (i) $V_H - C_H1$; (ii) $V_H - C_H2$; (iii) $V_H - C_H3$; (iv) $V_H - C_H1 - C_H2$; (v) $V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3$; (vi) $V_H - C_H2 - C_H3$; (vii) $V_H - C_L$; (viii) $V_L - C_H1$;

(ix) $V_L - C_{H2}$; (x) $V_L - C_{H3}$; (xi) $V_L - C_{H1} - C_{H2}$; (xii) $V_L - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3}$; (xiii) $V_L - C_{H2} - C_{H3}$; e (xiv) $V_L - C_L$. In qualsiasi configurazione di domini variabili e costanti, inclusa qualsiasi delle configurazioni esemplificative elencate sopra, i domini variabili e costanti possono essere o direttamente collegati l'uno all'altro o possono essere collegati da una cerniera completa o parziale o da una regione linker. Una regione cerniera può essere costituita da almeno 2 (per esempio, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o più) amminoacidi, i quali danno come risultato un collegamento flessibile o semi-flessibile tra domini variabili e/o costanti adiacenti in una singola molecola polipeptidica. Inoltre, un frammento di legame di antigene di un anticorpo della presente invenzione può comprendere un omo-dimero o un etero-dimero (o altro multimer) di qualsiasi delle configurazioni di domini variabili e costanti elencate sopra in una associazione non-covalente l'una con l'altra e/o con uno o più domini V_H o V_L monomerici (per esempio, mediante uno o più legami disolfuro).

Come per le molecole di anticorpi completi, i frammenti di legame di antigene possono essere mono-specifici o multi-specifici (per esempio, bi-

specifici). Un frammento di legame di antigene multi-specifico di un anticorpo comprende tipicamente almeno due domini variabili differenti, in cui ciascun dominio variabile è in grado di legarsi specificamente a un antigene separato o a un epitopo differente sullo stesso antigene. Qualsiasi formato di anticorpo multi-specifico, inclusi i formati di anticorpo bi-specifici esemplificativi divulgati nella presente, può essere adattato per l'uso nel contesto di un frammento di legame di antigene di un anticorpo della presente invenzione usando tecniche di routine disponibili nell'arte.

Preparazione di anticorpi umani

I metodi per la generazione di anticorpi umani in topi transgenici sono noti nell'arte. Qualsiasi di tali metodi noti può essere usato nel contesto della presente invenzione per realizzare anticorpi umani che si legano specificamente alla proteina C5.

Un immunogeno comprendente uno qualsiasi dei seguenti può essere usato per generare anticorpi per la proteina C5. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi dell'invenzione sono ottenuti da topi immunizzati con una proteina C5 nativa di lunghezza intera (si veda, per esempio, il numero di accesso GenBank NP_001726.2) (SEQ ID NO: 355), o con DNA

codificante la proteina o suo frammento. In alternativa, la proteina o un suo frammento può essere prodotta usando tecniche biochimiche standard e modificata e usata come immunogeno. In alcune forme di realizzazione dell'invenzione, l'immunogeno è un frammento della proteina C5 che varia da circa i residui amminoacidici 19 - 1676 della SEQ ID NO: 355. In alcune forme di realizzazione, l'immunogeno può essere una proteina C5 ricombinante o un suo frammento espresso in *E. coli* o in qualsiasi altra cellula eucariotica o di mammifero come cellule ovariche di criceto cinese (CHO).

Usando la tecnologia VELOCIMMUNE® (si veda, per esempio, US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) o qualsiasi altro metodo noto per generare anticorpi monoclonali, gli anticorpi chimerici ad elevata affinità per C5 vengono inizialmente isolati avendo una regione variabile umana e una regione costante di topo. La tecnologia VELOCIMMUNE® prevede la generazione di un topo transgenico avente un genoma comprendente regioni variabili di catena pesante e leggera umana operativamente collegate a loci di regioni costanti di topo endogene in modo tale che il topo produca un anticorpo comprendente una regione variabile umana e

una regione costante di topo in risposta alla stimolazione antigenica. Il DNA codificante le regioni variabili della catena pesante e leggera dell'anticorpo è isolato e operativamente collegato al DNA codificante le regioni costanti di catena pesante e leggera umana. Il DNA è quindi espresso in una cellula in grado di esprimere l'anticorpo completamente umano.

Generalmente, un topo VELOCIMMUNE® viene esposto all'antigene di interesse, e le cellule linfatiche (come le cellule B) sono recuperate dai topi che esprimono anticorpi. Le cellule linfatiche possono essere fuse con una linea cellulare di mieloma per preparare le linee cellulari di ibridoma immortali, e tali linee cellulari di ibridoma sono sottoposte a screening e selezionate per identificare linee cellulari di ibridoma che producono anticorpi specifici per l'antigene di interesse. Il DNA codificante le regioni variabili della catena pesante e della catena leggera può essere isolato e collegato a regioni costanti isotipiche desiderabili della catena pesante e della catena leggera. Una tale proteina di anticorpo può essere prodotta in una cellula, come una cellula CHO. In alternativa, il DNA codificante gli anticorpi chimerici antigene-

specifici o i domini variabili delle catene leggera e pesante possono essere isolati direttamente dai linfociti antigene-specifici.

Inizialmente, sono isolati gli anticorpi chimerici ad elevata affinità aventi una regione variabile umana e una regione costante di topo. Come nella sezione sperimentale sottostante, gli anticorpi sono caratterizzati e selezionati per caratteristiche desiderabili, inclusa affinità, selettività, epitopo, ecc. Le regioni costanti di topo sono sostituite con una regione costante umana desiderata per generare l'anticorpo completamente umano dell'invenzione, per esempio IgG1 o IgG4 di tipo selvatico o modificato. Sebbene la regione costante selezionata possa variare a seconda dell'uso specifico, le caratteristiche di legame di antigene ad alta affinità e di specificità di bersaglio risiedono nella regione variabile.

Bioequivalenti

Gli anticorpi anti-C5 e i frammenti di anticorpo descritti nella presente abbracciano proteine aventi sequenze amminoacidiche che variano da quelle degli anticorpi descritti, ma che mantengono la capacità di legarsi alla proteina C5. Tali anticorpi e frammenti di anticorpo varianti comprendono una o più addizioni, delezioni o sostituzioni di amminoacidi

rispetto alla sequenza parentale, ma esibiscono attività biologica che è essenzialmente equivalente a quella degli anticorpi descritti. Analogamente, le sequenze di DNA codificante l'anticorpo descritte nella presente abbracciano sequenze che comprendono una o più addizioni, delezioni o sostituzioni di nucleotidi quando confrontate con la sequenza divulgata, ma che codificano un anticorpo o frammento di anticorpo che è essenzialmente bioequivalente a un anticorpo o frammento di anticorpo descritto nella presente.

Due proteine di legame di antigene, o anticorpi, sono considerate bioequivalenti se, per esempio, sono equivalenti farmaceutici o alternative farmaceutiche il cui tasso e grado di assorbimento non mostrano una differenza significativa quando somministrate alla stessa dose molare in condizioni sperimentali simili, sia dose singola che dosi multiple. Alcuni anticorpi vengono considerati equivalenti o alternativi farmaceutiche se essi sono equivalenti nella misura del loro assorbimento ma non del loro tasso di assorbimento e ancora possono essere considerati bioequivalenti perché tali differenze nel tasso di assorbimento sono intenzionali e sono riflesse nella marcatura, e non sono essenziali per il conseguimento

delle concentrazioni efficaci di farmaco nel corpo su, *per esempio*, uso cronico, e sono considerate insignificanti dal punto di vista medico per il particolare prodotto di farmaco studiato.

In una forma di realizzazione, due proteine di legame di antigene sono bioequivalenti se non ci sono differenze clinicamente significative nella loro sicurezza, purezza o potenza.

In una forma di realizzazione, due proteine di legame di antigene sono bioequivalenti se un paziente può essere commutato una o più volte tra il prodotto di riferimento e il prodotto biologico senza un aumento atteso del rischio di effetti avversi, incluso un cambiamento clinicamente significativo dell'immunogenicità, o una diminuita efficacia, rispetto alla terapia continuata senza tale commutazione.

In una forma di realizzazione, due proteine di legame di antigene sono bioequivalenti se agiscono entrambe mediante un meccanismo o meccanismi di azione comuni per la condizione o le condizioni d'uso, nella misura che tali meccanismi siano noti.

La bioequivalenza può essere dimostrata mediante metodi *in vivo* e/o *in vitro*. Misure di bioequivalenza includono, *per esempio*, (a) un test *in vivo* negli

umani o in altri mammiferi, in cui la concentrazione dell'anticorpo o dei suoi metaboliti è misurata nel sangue, plasma, siero, o altro fluido biologico come una funzione del tempo; (b) un test *in vitro* che è stato correlato con e che è ragionevolmente predittivo dei dati di biodisponibilità in vivo umani; (c) un test *in vivo* negli esseri umani o in altri mammiferi in cui l'effetto farmacologico acuto appropriato dell'anticorpo (o del suo bersaglio) è misurato come una funzione del tempo; e (d) in uno studio clinico ben controllato che stabilisce la sicurezza, l'efficacia, o la biodisponibilità o bioequivalenza di un anticorpo.

Varianti bioequivalenti degli anticorpi descritti nella presente possono essere costruite, per esempio, realizzando varie sostituzioni di residui o sequenze o eliminando residui o sequenze terminali o interni non necessari per l'attività biologica. Per esempio, i residui di cisteina non essenziali per l'attività biologica possono essere deleti o sostituiti con altri amminoacidi per impedire la formazione di ponti disolfuro intramolecolari non necessari o non corretti alla rinaturazione. In altri contesti, gli anticorpi bioequivalenti possono includere varianti di anticorpi comprendenti cambiamenti di amminoacidi,

che modificano le caratteristiche di glicosilazione degli anticorpi, per esempio, mutazioni che eliminano o rimuovono la glicosilazione.

Anticorpi anti-C5 comprendenti Fc varianti

Gli anticorpi anti-C5 forniti nella presente comprendono un dominio Fc comprendente una o più mutazioni che potenziano o diminuiscono il legame degli anticorpi al recettore FcRn, per esempio, a pH acido rispetto a pH neutro. Per esempio, la presente invenzione include anticorpi anti-C5 comprendenti una mutazione nella regione C_{H2} o C_{H3} del dominio Fc, in cui l'una o più mutazioni aumentano l'affinità del dominio Fc per FcRn in un ambiente acido (per esempio, in un endosoma in cui il pH varia da circa 5,5 a circa 6,0). Tali mutazioni possono dare come risultato un aumento dell'emivita nel siero dell'anticorpo quando somministrato a un animale. Esempi non limitativi di tali modifiche di Fc includono, per esempio, una modifica in posizione 250 (per esempio, E o Q); 250 e 428 (per esempio, L o F); 252 (per esempio, L/Y/F/W o T), 254 (per esempio, S o T), e 256 (per esempio, S/R/Q/E/D o T); o una modifica in posizione 428 e/o 433 (per esempio, H/L/R/S/P/Q o K) e/o 434 (per esempio, A, W, H, F o Y [N434A, N434W, N434H, N434F o N434Y]); o una modifica

in posizione 250 e/o 428; o una modifica in posizione 307 o 308 (*per esempio*, 308F, V308F), e 434. La modifica può comprendere una modifica di 428L (*per esempio*, M428L) e 434S (*per esempio*, N434S); una modifica di 428L, 259I (*per esempio*, V259I), e 308F (*per esempio*, V308F); una modifica di 433K (*per esempio*, H433K) e di 434 (*per esempio*, 434Y); una modifica di 252, 254, e 256 (*per esempio*, 252Y, 254T, e 256E); una modifica di 250Q e 428L (*per esempio*, T250Q e M428L); e una modifica 307 e/o 308 (*per esempio*, 308F o 308P). La modifica può comprendere una modifica 265A (*per esempio*, D265A) e/o 297A (*per esempio*, N297A).

Per esempio, gli anticorpi anti-C5 possono comprendere un dominio Fc comprendente una o più coppie o gruppi di mutazioni selezionati dal gruppo costituito da: 250Q e 248L (*per esempio*, T250Q e M248L); 252Y, 254T e 256E (*per esempio*, M252Y, S254T e T256E); 428L e 434S (*per esempio*, M428L e N434S); 257I e 311I (*per esempio*, P257I e Q311I); 257I e 434H (*per esempio*, P257I e N434H); 376V e 434H (*per esempio*, D376V e N434H); 307A, 380A e 434A (*per esempio*, T307A, E380A e N434A); e 433K e 434F (*per esempio*, H433K e N434F). Tutte le possibili combinazioni delle precedenti mutazioni del dominio

Fc e altre mutazioni all'interno dei domini variabili degli anticorpi descritti nella presente, sono contemplate nella presente divulgazione.

Gli anticorpi anti-C5 divulgati nella presente possono comprendere una regione costante di catena pesante (C_H) chimerica, in cui la regione C_H chimerica comprende segmenti derivati dalle regioni C_H di più di un isotipo di immunoglobulina. Per esempio, gli anticorpi possono comprendere una regione C_H chimerica comprendente parte o tutto di un dominio C_{H2} derivato da una molecola di IgG1 umana, IgG2 umana o IgG4 umana, combinata con parte o tutto di un dominio C_{H3} derivato da una molecola di IgG1 umana, IgG2 umana o IgG4 umana. Gli anticorpi divulgati nella presente possono comprendere una regione C_H chimerica avente una regione cerniera chimerica. Per esempio, una cerniera chimerica può comprendere una sequenza amminoacidica di "cerniera superiore" (residui amminoacidici dalle posizioni da 216 a 227 secondo la numerazione EU) derivata da una regione cerniera di IgG1 umana, IgG2 umana o IgG4 umana, combinata con una sequenza di "cerniera inferiore" (residui amminoacidici dalle posizioni da 228 a 236 secondo la numerazione EU) derivata da una regione cerniera di IgG1 umana, IgG2 umana o IgG4

umana. La regione cerniera chimerica può comprendere residui amminoacidici derivati da una cerniera superiore di IgG1 umana o IgG4 umana e residui amminoacidici derivati da una cerniera inferiore di IgG2 umana. Un anticorpo comprendente una regione C_H chimerica come descritta nella presente può presentare funzioni effettrici di Fc modificate senza influenzare negativamente le proprietà terapeutiche o farmacocinetiche dell'anticorpo. (Si veda, per esempio, la pubblicazione della domanda di brevetto U.S. 2014/0243504).

Caratteristiche biologiche degli anticorpi

In generale, gli anticorpi prodotti mediante il metodo della presente invenzione funzionano legandosi alla proteina C5 e impedendone il suo clivaggio in C5a e C5b. Per esempio, gli anticorpi e i frammenti di legame di antigene di anticorpi descritti nella presente possono legarsi alla proteina C5 (per esempio, a 25°C o a 37°C) con una K_D minore di 9nM come misurata mediante risonanza plasmonica di superficie, per esempio, usando il formato di saggio come definito nell'Esempio 3 nella presente. Gli anticorpi o i loro frammenti di legame di antigene possono legarsi a C5 con una K_D minore di circa 9nM, minore di circa 5nM, minore di circa 2nM, minore di

circa 1nM, minore di circa 500pM, minore di 250pM, o minore di 100pM, come misurato mediante risonanza plasmonica di superficie, per esempio, usando il formato di saggio come definito nell'Esempio 3 nella presente, o un saggio sostanzialmente simile.

Gli anticorpi e i loro frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono legarsi alla proteina C5 umana con un'emivita dissociativa ($t_{1/2}$) maggiore di circa 2 minuti come misurata mediante risonanza plasmonica di superficie a 25°C, per esempio usando un formato di saggio come definito nell'Esempio 4 nella presente, o un saggio sostanzialmente simile. Gli anticorpi o frammenti di legame di antigene possono legarsi alla proteina C5 con una $t_{1/2}$ maggiore di circa 5 minuti, maggiore di circa 10 minuti, maggiore di circa 30 minuti, maggiore di circa 50 minuti, maggiore di circa 100 minuti, maggiore di circa 150 minuti, maggiore di circa 200 minuti, o maggiore di circa 250 minuti, come misurato mediante risonanza plasmonica di superficie a 25°C, per esempio, usando un formato di saggio come definito nell'Esempio 3 nella presente (per esempio, un formato di cattura di mAb o di cattura di antigene), o un saggio sostanzialmente simile.

Gli anticorpi e i loro frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono legarsi alla proteina C5 umana con un'emivita dissociativa ($t_{1/2}$) maggiore di circa 1,5 minuti come misurata mediante risonanza plasmonica di superficie a 37°C, *per esempio* usando un formato di saggio come definito nell'Esempio 4 nella presente, o un saggio sostanzialmente simile. Gli anticorpi o frammenti di legame di antigene possono legarsi alla proteina C5 con una $t_{1/2}$ maggiore di circa 2 minuti, maggiore di circa 5 minuti, maggiore di circa 10 minuti, maggiore di circa 25 minuti, maggiore di circa 50 minuti, maggiore di circa 100 minuti, maggiore di circa 150 minuti, o maggiore di circa 200 minuti, come misurato mediante risonanza plasmonica di superficie a 25°C, *per esempio*, usando un formato di saggio come definito nell'Esempio 3 nella presente (*per esempio*, un formato di cattura di mAb o di cattura di antigene), o un saggio sostanzialmente simile.

Gli anticorpi e i frammenti di legame di antigene di anticorpi descritti nella presente possono legarsi alla proteina C5 di scimmia (*per esempio*, a 25°C o a 37°C) con una K_D minore di 120nM come misurata mediante risonanza plasmonica di superficie, *per esempio*, usando il formato di saggio come definito

nell'Esempio 3 nella presente. Gli anticorpi o i loro frammenti di legame di antigene possono legarsi a C5 di scimmia con una K_D minore di circa 120nM, minore di circa 100nM, minore di circa 50nM, minore di circa 25nM, minore di circa 10nM, minore di circa 5nM, minore di circa 1nM, minore di circa 500pM, o minore di 250pM, come misurato mediante risonanza plasmonica di superficie, *per esempio*, usando il formato di saggio come definito nell'Esempio 3 nella presente, o un saggio sostanzialmente simile.

Gli anticorpi e i frammenti di legame di antigene di anticorpi descritti nella presente possono legarsi alla proteina C5 umano modificato con il cambiamento R885H (esemplificato dalla SEQ ID NO: 356) con una K_D minore di 0,5nM come misurata mediante risonanza plasmonica di superficie, *per esempio*, usando il formato di saggio come definito nell'Esempio 3 nella presente. Le varianti di C5 hanno mostrato una scarsa risposta agli anticorpi anti-C5 precedentemente divulgati nell'arte (*per esempio*, Nishimura *et al* 2014, New Engl. J. Med. 370: 632-639). Gli anticorpi o i loro frammenti di legame di antigene possono legarsi a C5 umano modificata con una K_D minore di circa 65nM, minore di circa 50nM, minore di circa 20nM, minore di circa 10nM, minore di circa 5nM,

minore di circa 3nM, o minore di 2nM, come misurato mediante risonanza plasmonica di superficie, per esempio, usando il formato di saggio come definito nell'Esempio 3 nella presente, o un saggio sostanzialmente simile.

Gli anticorpi e i frammenti di legame di antigene di anticorpi descritti nella presente possono legarsi alla proteina C5 umano modificato con il cambiamento R885C (esemplificato dalla SEQ ID NO: 357) con una K_D minore di 160nM come misurata mediante risonanza plasmonica di superficie, per esempio, usando il formato di saggio come definito nell'Esempio 3 nella presente. Le varianti di C5 hanno mostrato una scarsa risposta agli anticorpi anti-C5 precedentemente divulgati nell'arte (per esempio, Nishimura et al 2014, New Engl. J. Med. 370: 632-639). Gli anticorpi o i loro frammenti di legame di antigene possono legarsi a C5 umano modificata con una K_D minore di circa 150nM, minore di circa 100nM, minore di circa 50nM, minore di circa 20nM, minore di circa 10nM, minore di circa 5nM, o minore di 2nM, come misurato mediante risonanza plasmonica di superficie, per esempio, usando il formato di saggio come definito nell'Esempio 3 nella presente, o un saggio sostanzialmente simile.

Gli anticorpi e i frammenti di legame di antigene di anticorpi descritti nella presente possono inibire la citotossicità dipendente dal complemento (CDC) con IC_{50} minore di 10nM come misurata mediante un saggio di luminescenza, *per esempio*, usando il formato di saggio come definito nell'Esempio 6 nella presente. Gli anticorpi o i loro frammenti di legame di antigene possono inibire la CDC con IC_{50} minore di circa 5nM, minore di circa 3,5nM, o minore di circa 2nM, come misurato mediante un saggio di luminescenza di cellule B, *per esempio*, usando il formato di saggio come definito nell'Esempio 6 nella presente, o un saggio sostanzialmente simile.

Gli anticorpi e i frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono bloccare l'emolisi della via classica (CP) mediata da C5 umano di oltre il 94% e con una IC_{50} minore di 6nM, come misurata mediante un saggio di emolisi di CP, *per esempio* usando il formato di saggio come definito nell'Esempio 8 nella presente. Gli anticorpi o i loro frammenti di legame di antigene possono bloccare l'emolisi di CP con IC_{50} minore di circa 6nM, minore di circa 5nM, minore di circa 4nM, minore di circa 3nM, o minore di circa 2nM, come misurato mediante saggio di emolisi di CP, *per esempio*, usando il

formato di saggio come definito nell'Esempio 8 nella presente, o un saggio sostanzialmente simile.

Gli anticorpi e i frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono bloccare l'emolisi della via alternativa mediata da C5 (AP) umano di oltre il 70% e con una IC_{50} minore di 165nM, come misurata mediante un saggio di emolisi di AP, *per esempio*, usando il formato di saggio come definito nell'Esempio 8 nella presente. Gli anticorpi o i loro frammenti di legame di antigene possono bloccare l'emolisi di AP con IC_{50} minore di circa 160nM, minore di circa 150nM, minore di circa 100nM, minore di circa 50nM, o minore di circa 20nM, come misurato mediante saggio di emolisi di AP, *per esempio*, usando il formato di saggio come definito nell'Esempio 8 nella presente, o un saggio sostanzialmente simile.

Gli anticorpi e i frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono bloccare l'emolisi della via classica (CP) mediata da C5 di scimmia verde africana di oltre il 40% e con una IC_{50} minore di 185nM, come misurata mediante un saggio di emolisi di CP, *per esempio*, usando il formato di saggio come definito nell'Esempio 8 nella presente. Gli anticorpi o i loro frammenti di legame di antigene possono bloccare l'emolisi di CP con IC_{50} minore di circa

180nM, minore di circa 150nM, minore di circa 100nM, minore di circa 75nM, o minore di circa 50nM, come misurato mediante saggio di emolisi di CP, per esempio, usando il formato di saggio come definito nell'Esempio 8 nella presente, o un saggio sostanzialmente simile.

Gli anticorpi e i frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono bloccare l'emolisi della via alternativa (AP) mediata da C5 di scimmia verde africana con una IC_{50} minore di 235nM, come misurata mediante un saggio di emolisi di AP, per esempio, usando il formato di saggio come definito nell'Esempio 8 nella presente. Gli anticorpi o i loro frammenti di legame di antigene possono bloccare l'emolisi di AP con IC_{50} minore di circa 200nM, minore di circa 150nM, minore di circa 100nM, minore di circa 50nM, o minore di circa 20nM, come misurato mediante saggio di emolisi di AP, per esempio, usando il formato di saggio come definito nell'Esempio 8 nella presente, o un saggio sostanzialmente simile.

Gli anticorpi e i frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono bloccare oltre il 90% dell'emolisi della via classica (CP) mediata da C5 della scimmia cinomolgo con una IC_{50} minore di 145nM, come misurata mediante un saggio di emolisi di

CP, *per esempio* usando il formato di saggio come definito nell'Esempio 8 nella presente. Gli anticorpi o i loro frammenti di legame di antigene possono bloccare l'emolisi di CP con IC_{50} minore di circa 140nM, minore di circa 120nM, minore di circa 100nM, minore di circa 75nM, o minore di circa 50nM, come misurato mediante saggio di emolisi di CP, *per esempio*, usando il formato di saggio come definito nell'Esempio 8 nella presente, o un saggio sostanzialmente simile.

Gli anticorpi e i frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono bloccare l'emolisi della via alternativa (AP) mediata da C5 di scimmia cinomolgo con una IC_{50} minore di 30nM, come misurata mediante un saggio di emolisi di AP, *per esempio*, usando il formato di saggio come definito nell'Esempio 8 nella presente. Gli anticorpi o i loro frammenti di legame di antigene possono bloccare l'emolisi di AP con IC_{50} minore di circa 25nM, minore di circa 20nM, minore di circa 10nM, minore di circa 5nM, o minore di circa 2nM, come misurato mediante saggio di emolisi di AP, *per esempio*, usando il formato di saggio come definito nell'Esempio 8 nella presente, o un saggio sostanzialmente simile.

Gli anticorpi e i frammenti di legame di antigene

descritti nella presente possono mostrare proprietà farmacocinetiche (PK) e farmacodinamiche (PD) migliorate rispetto agli anticorpi anti-C5 nell'arte. Gli anticorpi anti-C5 descritti nella presente mostrano una minore suscettibilità alla clearance mediata dal bersaglio dopo la somministrazione, come mostrato negli Esempi 9 e 10 nella presente. Gli anticorpi anti-C5 e i loro frammenti di legame di antigene possono mostrare concentrazioni nel siero per periodi prolungati, *per esempio*, più di 20 giorni, più di 25 giorni, più di 30 giorni, più di 35 giorni, più di 40 giorni, più di 45 giorni, più di 50 giorni, più di 55 giorni, o più di 60 giorni, come descritto negli Esempi 9 e 10 nella presente. Gli anticorpi anti-C5 possono mostrare un'emivita nel siero prolungata di oltre 10 giorni, rispetto agli anticorpi anti-C5 nell'arte.

Gli anticorpi anti-C5 e i loro frammenti di legame di antigene possono avere elevata affinità per C5 umano (*per esempio*, K_D minore di 0,3nM) e una clearance minore (*per esempio*, emivita nel siero prolungata, attività farmacodinamica migliorata nel corso di più giorni rispetto agli anticorpi anti-C5 precedentemente noti). Tali anticorpi possono essere vantaggiosamente usati con un dosaggio meno frequente

in un soggetto con una malattia o disturbo associato a C5.

In un caso, la presente divulgazione riguarda un anticorpo ricombinante isolato o suo frammento di legame di antigene che si lega specificamente alla proteina C5, in cui l'anticorpo o suo frammento presenta una o più delle seguenti caratteristiche:

- (a) è un anticorpo monoclonale completamente umano;
- (b) si lega a C5 umano con una costante di dissociazione (K_D) minore di 0,9nM a 25°C, come misurata in un saggio di risonanza plasmonica di superficie;
- (c) si lega a C5 umano con una K_D minore di 0,3nM a 37°C, come misurata in un saggio di risonanza plasmonica di superficie;
- (d) ha una concentrazione nel siero maggiore di 10 µg/mL fino al giorno 70 dopo la somministrazione alla scimmia cinomolgo;
- (e) blocca l'emolisi di CP e AP fino al giorno 35 dopo la somministrazione alla scimmia cinomolgo, come misurata in un saggio di emolisi ex vivo;
- (f) ha un'emivita nel siero maggiore di 10 giorni nella scimmia cinomolgo;
- (g) ha una concentrazione nel siero maggiore di 10 µg/mL fino al giorno 40 dopo la somministrazione a topi C5-umanizzati;
- (h) blocca l'emolisi di CP fino al giorno 30 dopo la somministrazione a topi C5-umanizzati,

come misurata in un saggio di emolisi *ex vivo*; e (i) ha un'emivita nel siero maggiore di 10 giorni in topi C5-umanizzati.

In un caso, la presente divulgazione riguarda un anticorpo ricombinante isolato o suo frammento di legame di antigene che si lega specificamente alla proteina C5, in cui l'anticorpo o suo frammento presenta una o più delle seguenti caratteristiche:

- (a) è un anticorpo monoclonale completamente umano;
- (b) si lega a C5 umano con una costante di dissociazione (K_D) minore di 0,9nM a 25°C, come misurata in un saggio di risonanza plasmonica di superficie;
- (c) si lega a C5 umano con una K_D minore di 0,3nM a 37°C, come misurata in un saggio di risonanza plasmonica di superficie;
- (d) si lega a C5 di scimmia con una K_D minore di 65nM, come misurata in un saggio di risonanza plasmonica di superficie;
- (e) si lega alla variante di C5 umano R885H (SEQ ID NO: 356) con una K_D minore di 0,5nM, come misurata in un saggio di risonanza plasmonica di superficie;
- (f) si lega alla variante di C5 umano R885C (SEQ ID NO: 357) con una K_D minore di 0,5nM, come misurata in un saggio di risonanza plasmonica di superficie;
- (g) blocca l'emolisi della via classica (CP) mediata da C5 umano di oltre il 95% e con IC_{50} minore di 6nM,

come misurata in un saggio di emolisi di CP; (h) blocca l'emolisi della via alternativa (AP) mediata da C5 umano di oltre il 70% e con IC_{50} minore di 165nM, come misurata in un saggio di emolisi di AP; (i) inibisce l'emolisi di CP mediata da C5 di scimmia verde africana con IC_{50} minore di 185nM, come misurata in un saggio di emolisi di CP; (j) inibisce l'emolisi di AP mediata da C5 di scimmia verde africana con IC_{50} minore di 235nM, come misurata in un saggio di emolisi di AP; (k) inibisce l'emolisi di CP mediata da C5 di scimmia cinomolgo con IC_{50} minore di 145nM, come misurata in un saggio di emolisi di CP; e (l) inibisce l'emolisi di AP mediata da C5 di scimmia cinomolgo con IC_{50} minore di 30nM, come misurata in un saggio di emolisi di AP.

Gli anticorpi descritti nella presente possono possedere una o più delle suddette caratteristiche biologiche, o qualsiasi loro combinazione. Altre caratteristiche biologiche degli anticorpi descritti nella presente diventano evidenti a un esperto del ramo di ordinaria competenza da una revisione della presente divulgazione inclusi gli Esempi di lavoro nella presente.

Mappatura di epitopi e tecnologie correlate

La presente divulgazione riguarda anticorpi anti-C5

che interagiscono con uno o più amminoacidi trovati all'interno di una o più regioni della molecola di proteina C5 inclusi, l'alfa polipeptide e il polipeptide beta. L'epitopo a cui gli anticorpi si legano può essere costituito da una singola sequenza contigua di 3 o più (*per esempio, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o più*) amminoacidi situati all'interno di qualsiasi dei suddetti domini della molecola di proteina C5 (*per esempio un epitopo lineare in un dominio*). In alternativa, l'epitopo può essere costituito da una pluralità di amminoacidi (o sequenze amminoacidiche) non contigui situati all'interno di uno o di entrambi i domini summenzionati della molecola proteica (*per esempio un epitopo conformazionale*).

Varie tecniche note all'esperto del ramo di ordinaria competenza possono essere usate per determinare se un anticorpo "interagisce con uno o più amminoacidi" all'interno di un polipeptide o proteina. Tecniche esemplificative includono, per esempio, saggi di blocco incrociato di routine, come quello descritto in *Antibodies*, Harlow e Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Altri metodi includono l'analisi mutazionale di scansione di alanina, l'analisi blot di peptide (Reineke (2004)

Methods Mol. Biol. 248: 443-63), studi cristallografici di analisi di clivaggio peptidico e analisi NMR. Inoltre, possono essere impiegati metodi come escissione di epitopo, estrazione di epitopo e la modifica chimica di antigeni (Tomer (2000) Prot. Sci. 9: 487-496). Un altro metodo che può essere usato per identificare gli amminoacidi all'interno di un polipeptide con cui un anticorpo interagisce è lo scambio idrogeno/deuterio rilevato mediante spettrometria di massa. In termini generali, il metodo di scambio idrogeno/deuterio comporta l'etichettatura con deuterio della proteina di interesse, seguita dal legame dell'anticorpo alla proteina etichettata con deuterio. Successivamente, il complesso proteina/anticorpo viene trasferito in acqua e i protoni scambiabili all'interno di amminoacidi che sono protetti dal complesso di anticorpo subiscono un retroscambio deuterio-idrogeno a un tasso più lento rispetto ai protoni scambiabili all'interno di amminoacidi che non fanno parte dell'interfaccia. Come risultato, gli amminoacidi che fanno parte dell'interfaccia proteina/anticorpo possono trattenere il deuterio e quindi esibire una massa relativamente più alta rispetto agli amminoacidi non inclusi nell'interfaccia. Dopo la

dissociazione dell'anticorpo, la proteina bersaglio è sottoposta a clivaggio con proteasi e analisi mediante spettrometria di massa, rivelando in tal modo i residui marcati con deuterio che corrispondono agli amminoacidi specifici con cui l'anticorpo interagisce. *Si vedano, per esempio, Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267: 252-259; Engen e Smith (2001) Anal. Chem. 73: 256A-265A.*

Il termine "epitopo" si riferisce anche a un sito su un antigene a cui rispondono le cellule B e/o T. Gli epitopi delle cellule B possono essere formati sia da amminoacidi contigui sia da amminoacidi non contigui giustapposti mediante ripiegamento terziario di una proteina. Gli epitopi formati da amminoacidi contigui sono tipicamente mantenuti all'esposizione a solventi denaturanti, mentre gli epitopi formati dal ripiegamento terziario sono tipicamente persi al trattamento con solventi denaturanti. Un epitopo include tipicamente almeno 3, e più solitamente, almeno 5 o 8-10 amminoacidi in una conformazione spaziale unica.

La profilazione assistita da modifiche (MAP) nota anche come profilazione di anticorpo basata sulla struttura di antigene (ASAP) è un metodo che categorizza un gran numero di anticorpi monoclonali

(mAb) diretti contro lo stesso antigene secondo le somiglianze del profilo di legame di ciascun anticorpo a superfici di antigene modificate chimicamente o enzimaticamente (si veda US 2004/0101920). Ciascuna categoria può riflettere un epitopo unico o distintamente differente o parzialmente sovrapposto all'epitopo rappresentato da un'altra categoria. Questa tecnologia consente un rapido filtraggio di anticorpi geneticamente identici, in modo che la caratterizzazione possa essere focalizzata su anticorpi geneticamente distinti. Quando applicata allo screening di ibridomi, MAP può facilitare l'identificazione di cloni di ibridomi rari che producono mAb aventi le caratteristiche desiderate. MAP può essere usata per ordinare gli anticorpi descritti nella presente in gruppi di anticorpi che si legano a epitopi differenti.

Gli anticorpi anti-C5 o i loro frammenti di legame di antigene descritti nella presente possono legarsi a un epitopo all'interno di qualsiasi o più delle regioni esemplificate nella proteina C5, o nella forma naturale, come esemplificato nella SEQ ID NO: 355, o prodotta in modo ricombinante, o a un loro frammento. Gli anticorpi possono legarsi a una

regione comprendente uno o più amminoacidi selezionati dal gruppo costituito dai residui amminoacidici 19 - 1676 della proteina C5 umana.

Gli anticorpi possono interagire con almeno una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito dai residui amminoacidici che variano da circa la posizione 19 a circa la posizione 750; o dai residui amminoacidici che vanno da circa la posizione 751 a circa la posizione 1676 della SEQ ID NO: 355.

Gli anticorpi anti-C5 e i loro frammenti di legame di antigene possono interagire con uno o più epitopi trovati all'interno dell'alfa e/o della catena beta di C5 (SEQ ID NO: 359). L'uno o più epitopi possono essere costituiti da una o più sequenze contigue di 3 o più (*per esempio, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o più*) amminoacidi situati all'interno della catena alfa e/o della catena beta di C5. In alternativa, l'epitopo può essere costituito da una pluralità di amminoacidi (o sequenze amminoacidiche) non contigui situati all'interno di C5. Come mostrato nell'Esempio 11 nella presente, l'epitopo di C5 con cui interagisce l'anticorpo esemplificativo prodotto mediante il metodo dell'invenzione H4H12166P è definito da: (i) la sequenza amminoacidica NMATGMDSW (SEQ ID NO: 360)

che corrisponde agli amminoacidi da 591 a 599 compresi nella catena beta della SEQ ID NO: 359; e (ii) la sequenza amminoacidica WEVHLVPRRKQLQFALPDSL (SEQ ID NO: 361), che corrisponde agli amminoacidi da 775 a 794 compresi nella catena alfa della SEQ ID NO: 359. Di conseguenza, gli anticorpi anti-C5 possono interagire con uno o più amminoacidi contenuti all'interno della regione costituita da (i) la sequenza amminoacidica NMATGMDSW (SEQ ID NO: 360), che corrisponde agli amminoacidi da 591 a 599 della SEQ ID NO: 359; e (ii) la sequenza amminoacidica WEVHLVPRRKQLQFALPDSL (SEQ ID NO: 361), che corrisponde agli amminoacidi da 775 a 794 della SEQ ID NO: 359.

La presente divulgazione include anticorpi anti-C5 che si legano allo stesso epitopo, o a una porzione dell'epitopo, come qualsiasi degli anticorpi esemplificativi specifici elencati nella Tabella 1. Analogamente, la presente divulgazione include anche anticorpi anti-C5 che competono per il legame alla proteina C5 o a un suo frammento con qualsiasi degli anticorpi esemplificativi specifici elencati nella Tabella 1. Per esempio, anticorpi anti-C5 che competono in modo incrociato per il legame alla proteina C5 con uno o più anticorpi elencati nella

Tabella 1.

Si può facilmente determinare se un anticorpo si lega allo stesso epitopo di, o compete per il legame con, un anticorpo anti-C5 di riferimento usando metodi di routine noti nell'arte. Per esempio, per determinare se un anticorpo di test si lega allo stesso epitopo di un anticorpo anti-C5 di riferimento, l'anticorpo di riferimento è lasciato legarsi a una proteina o peptide C5 in condizioni di saturazione. Successivamente, viene valutata la capacità di un anticorpo di test di legarsi alla molecola di proteina C5. Se l'anticorpo di test è in grado di legarsi a C5 in seguito al legame di saturazione con l'anticorpo anti-C5 di riferimento, si può concludere che l'anticorpo di test si lega a un epitopo differente rispetto all'anticorpo anti-C5 di riferimento. D'altra parte, se l'anticorpo di test non è in grado di legarsi alla proteina C5 in seguito al legame di saturazione con l'anticorpo anti-C5 di riferimento, allora l'anticorpo di test può legarsi allo stesso epitopo dell'epitopo legato dall'anticorpo anti-C5 di riferimento.

Per determinare se un anticorpo compete per il legame con un anticorpo anti-C5 di riferimento, la metodologia di legame descritta sopra viene eseguita

in due orientamenti: In un primo orientamento, l'anticorpo di riferimento è lasciato legarsi a una proteina C5 in condizioni di saturazione seguito da valutazione del legame dell'anticorpo di test alla molecola C5. In un secondo orientamento, l'anticorpo di test è lasciato legarsi a una molecola C5 in condizioni di saturazione seguito da valutazione del legame dell'anticorpo di riferimento alla molecola C5. Se, in entrambi gli orientamenti, solo il primo anticorpo (di saturazione) è in grado di legarsi alla molecola C5, allora si conclude che l'anticorpo di test e l'anticorpo di riferimento competono per il legame a C5. Come apprezza un esperto del ramo di ordinaria competenza, un anticorpo che compete per il legame con un anticorpo di riferimento può non necessariamente legarsi all'identico epitopo dell'anticorpo di riferimento, ma può bloccare stericamente il legame dell'anticorpo di riferimento legando un epitopo sovrapposto o adiacente.

Due anticorpi si legano allo stesso o sovrapposto epitopo se ciascuno inibisce (blocca) in modo competitivo il legame dell'altro all'antigene. Vale a dire, un eccesso di 1-, 5-, 10-, 20- o 100- volte di un anticorpo inibisce il legame dell'altro di almeno il 50% ma preferibilmente del 75%, del 90% o anche

del 99% come misurato in un saggio di legame competitivo (si veda, *per esempio*, Junghans *et al.*, Cancer Res. 1990 50:1495-1502). In alternativa, due anticorpi hanno lo stesso epitopo se essenzialmente tutte le mutazioni amminoacidiche nell'antigene che riducono o eliminano il legame di un anticorpo riducono o eliminano il legame dell'altro. Due anticorpi hanno epitopi sovrapposti se alcune mutazioni amminoacidiche che riducono o eliminano il legame di un anticorpo riducono o eliminano il legame dell'altro.

Sperimentazione di routine aggiuntiva (*per esempio*, analisi di legame e di mutazione di peptide) può quindi essere effettuata per confermare se la mancanza osservata del legame dell'anticorpo di test è infatti dovuta al legame allo stesso epitopo dell'anticorpo di riferimento o se il blocco sterico (o un altro fenomeno) è responsabile della mancanza del legame osservato. Esperimenti di questo tipo possono essere eseguiti usando ELISA, RIA, risonanza plasmonica di superficie, citometria di flusso o qualsiasi altro saggio di legame di anticorpo quantitativo o qualitativo disponibile nell'arte.

Immunoconiugati

La divulgazione abbraccia un anticorpo monoclonale

anti-C5 umano coniugato a un gruppo funzionale terapeutico ("immunoconiugato"), per trattare una malattia o un disturbo associato a C5 (*per esempio*, sindrome emolitica uremica atipica). Come usato nella presente, il termine "immunoconiugato" si riferisce a un anticorpo che è chimicamente o biologicamente collegato a un agente radioattivo, una citochina, un interferone, un gruppo funzionale bersaglio o reporter, un enzima, un peptide o proteina o un agente terapeutico. L'anticorpo può essere collegato all'agente radioattivo, citochina, interferone, porzione funzionale bersaglio o reporter, enzima, peptide o agente terapeutico in qualsiasi posizione lungo la molecola purché sia in grado di legarsi al suo bersaglio. Esempi di immunoconiugati includono coniugati di farmaci anticorpali e proteine di fusione anticorpo-tossina. L'agente può essere un secondo anticorpo differente per la proteina C5. Il tipo di gruppo funzionale terapeutico che può essere coniugato all'anticorpo anti-C5 e tiene conto della condizione da trattare e dell'effetto terapeutico desiderato da ottenere. Esempi di agenti idonei per la formazione di immunoconiugati sono noti nell'arte; si veda per esempio WO 05/103081.

Anticorpi multispecifici

Gli anticorpi prodotti mediante il metodo della presente invenzione possono essere mono-specifici, bi-specifici o multi-specifici. Gli anticorpi multi-specifici possono essere specifici per differenti epitopi di un polipeptide bersaglio o possono contenere domini di legame di antigene specifici per più di un polipeptide bersaglio. Si veda, *per esempio*, Tutt *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244.

Qualsiasi delle molecole di legame di antigene multi-specifiche prodotte mediante il metodo dell'invenzione, o loro varianti, può essere costruita usando tecniche biologiche molecolari standard (*per esempio*, tecnologia di espressione di DNA e proteine ricombinante), come sarà noto a un esperto del ramo di ordinaria competenza.

Gli anticorpi C5-specifici possono essere generati in un formato bi-specifico (un "bi-specifico") in cui regioni variabili che si legano a domini distinti di proteina C5 sono collegate insieme per conferire specificità a doppio dominio all'interno di una singola molecola di legame. I bi-specifici opportunamente progettati possono migliorare l'efficacia inibitoria complessiva della proteina C5 aumentando sia la specificità che l'avidità di

legame. Regioni variabili con specificità per singoli domini, (*per esempio*, segmenti del dominio N-terminale), o che possono legarsi a regioni differenti all'interno di un dominio, sono accoppiate su un'impalcatura strutturale che consente a ciascuna regione di legarsi simultaneamente a epitopi separati, o a regioni differenti all'interno di un dominio. In un esempio per un bi-specifico, regioni variabili di catena pesante (V_H) da un legante con specificità per un dominio sono ricombinate con regioni variabili di catena leggera (V_L) da una serie di leganti con specificità per un secondo dominio per identificare partner di V_L non cognati che possono essere accoppiati con una V_H originale senza interrompere la specificità originale per quella V_H . In questo modo, un singolo segmento di V_L (*per esempio*, V_{L1}) può essere combinato con due differenti domini V_H (*per esempio*, V_{H1} e V_{H2}) per generare un bi-specifico costituito da due "bracci" di legame ($V_{H1}-V_{L1}$ e $V_{H2}-V_{L1}$). L'uso di un singolo segmento di V_L riduce la complessità del sistema e quindi semplifica e aumenta l'efficienza nei processi di clonazione, espressione e purificazione usati per generare il bi-specifico (si veda, per esempio, USSN13/022759 e US2010/0331527).

In alternativa, anticorpi che si legano a più di un dominio e un secondo bersaglio, come, ma non limitati a, per esempio, un secondo anticorpo anti-C5 differente, possono essere preparati in un formato bi-specifico usando tecniche descritte nella presente, o altre tecniche note agli esperti del ramo. Regioni variabili di anticorpo che si legano a regioni distinte possono essere collegate insieme a regioni variabili che si legano a siti rilevanti, per esempio, sul dominio extracellulare di C5, per conferire specificità a doppio antigene all'interno di una singola molecola di legame. I bi-specifici appropriatamente progettati di questa natura svolgono una duplice funzione. Regioni variabili con specificità per il dominio extracellulare sono combinate con una regione variabile con specificità per l'esterno del dominio extracellulare e sono accoppiate su un'impalcatura strutturale che consente a ciascuna regione variabile di legarsi ad antigeni separati.

Un formato di anticorpo bi-specifico esemplificativo che può essere usato nel contesto della presente invenzione prevede l'uso di un primo dominio C_H3 di immunoglobulina (Ig) e di un secondo dominio C_H3 di Ig, in cui il primo e il secondo dominio C_H3 di Ig

differiscono l'uno dall'altro di almeno un amminoacido, e in cui almeno una differenza amminoacidica riduce il legame dell'anticorpo bi-specifico alla proteina A rispetto a un anticorpo bi-specifico privo della differenza di amminoacido. In una forma di realizzazione, il primo dominio C_H3 di Ig si lega alla Proteina A e il secondo dominio C_H3 di Ig contiene una mutazione che riduce o abolisce il legame della Proteina A come una modifica H95R (mediante la numerazione di esoni IMGT; H435R mediante la numerazione EU). Il secondo C_H3 può inoltre comprendere una modifica Y96F (mediante IMGT; Y436F mediante EU). Ulteriori modifiche che possono essere trovate all'interno del secondo C_H3 includono: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, e V82I (secondo IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, e V422I secondo EU) nel caso di anticorpi IgG1; N44S, K52N, e V82I (IMGT; N384S, K392N, e V422I secondo EU) nel caso di anticorpi IgG2; e Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, e V82I (secondo IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, e V422I secondo EU) nel caso di anticorpi IgG4. Variazioni sul formato di anticorpo bi-specifico descritto sopra sono contemplate nella portata della presente invenzione.

Altri formati bispecifici esemplificativi che possono

essere usati nel contesto della presente invenzione includono, senza limitazione, *per esempio*, formati bispecifici di diabody o basati su scFv, fusioni IgG-scFv, doppio dominio variabile (DVD)-Ig, Quadroma, nodi nelle cavità, catena leggera comune (*per esempio*, catena leggera comune con nodi nelle cavità, ecc.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, leucina zipper, Duobody, IgG1/IgG2, Fab a doppia azione (DAF)-IgG e formati bispecifici di Mab² (*si veda, per esempio*, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11, e i riferimenti citati al suo interno, per un riesame dei precedenti formati). Anticorpi bispecifici possono anche essere costruiti usando coniugazione peptide/acido nucleico, *per esempio*, in cui amminoacidi innaturali con reattività chimica ortogonale sono usati per generare coniugati anticorpo-oligonucleotide sito-specifici che poi si auto-assemblano in complessi multimerici con composizione, valenza e geometria definite. (*Si veda, per esempio*, Kazane *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: 4 Dic. 2012]).

Somministrazione terapeutica e formulazioni

Nel presente documento vengono fornite composizioni terapeutiche comprendenti gli anticorpi anti-C5 o loro frammenti di legame di antigene descritti nella

presente. Le composizioni terapeutiche descritte nella presente vengono somministrate con trasportatori, eccipienti e altri agenti idonei che sono incorporati in formulazioni per fornire trasferimento, erogazione, tolleranza e simili migliorati. Una moltitudine di formulazioni appropriate può essere trovata nel prontuario noto a tutti i chimici farmaceutici: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Queste formulazioni includono, per esempio, polveri, paste, unguenti, gelatine, cere, oli, lipidi, vescicole contenenti lipidi (cationici o anionici) (come LIPOFECTIN™), coniugati di DNA, paste di assorbimento anidro, emulsioni olio-in-acqua e acqua-in-olio, emulsioni carbowax (polietilenglicoli di vari pesi molecolari), gel semisolidi, e miscele semi-solide contenenti carbowax. Si veda anche Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

La dose di anticorpo può variare a seconda dell'età e della dimensione di un soggetto a cui va somministrata, malattia bersaglio, condizioni, della via di somministrazione e simili. Quando un anticorpo descritto nella presente viene usato per trattare una

malattia o un disturbo in un paziente adulto, o per prevenire una tale malattia, è vantaggioso somministrare l'anticorpo della presente invenzione normalmente a una singola dose da circa 0,1 a circa 100 mg/kg di peso corporeo, più preferibilmente da circa 5 a circa 80, da circa 10 a circa 70, o da circa 20 a circa 50 mg/kg di peso corporeo. In base alla gravità della condizione, la frequenza e la durata del trattamento può essere regolata. L'anticorpo o il suo frammento di legame di antigene descritto nella presente può essere somministrato come una dose iniziale di almeno da circa 0,1 mg a circa 800 mg, da circa 1 a circa 600 mg, da circa 5 a circa 500 mg o da circa 10 a circa 400 mg. In certe forme di realizzazione, la dose iniziale può essere seguita dalla somministrazione di una seconda o di una pluralità di dosi successive dell'anticorpo o del suo frammento di legame di antigene in una quantità che può essere approssimativamente la stessa o minore di quella della dose iniziale, in cui le dosi successive sono separate di almeno da 1 giorno a 3 giorni; di almeno una settimana, di almeno 2 settimane; di almeno 3 settimane; di almeno 4 settimane; di almeno 5 settimane; di almeno 6 settimane; di almeno 7 settimane; di almeno 8

settimane; di almeno 9 settimane; di almeno 10 settimane; di almeno 12 settimane; o di almeno 14 settimane.

Vari sistemi di erogazione sono noti e possono essere usati per somministrare la composizione farmaceutica descritta nella presente, per esempio, incapsulamento in liposomi, microparticelle, microcapsule, cellule ricombinanti in grado di esprimere i virus mutanti, endocitosi mediata da recettore (si veda, per esempio, Wu *et al.* (1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Metodi di introduzione includono, ma non sono limitati a, vie intradermiche, transdermiche, intramuscolari, intraperitoneali, intravenose, sottocutanee, intranasali, epidurali e orali. La composizione può essere somministrata mediante qualsiasi via appropriata, per esempio mediante infusione o iniezione con bolo, mediante assorbimento attraverso rivestimenti epiteliali o mucocutanei (per esempio mucosa orale, rettale e intestinale, ecc.), e può essere somministrata insieme ad altri agenti biologicamente attivi. La somministrazione può essere sistemica o locale. La composizione farmaceutica può anche essere erogata in una vescicola, in particolare un liposoma (si veda, per esempio, Langer (1990) *Science* 249:1527-1533).

Nella presente è anche contemplato l'uso di nanoparticelle per erogare gli anticorpi descritti nella presente. Nanoparticelle coniugate ad anticorpo possono essere usate sia per applicazioni terapeutiche che diagnostiche. Le nanoparticelle coniugate ad anticorpi e i metodi di preparazione e uso sono descritti in dettaglio da Arruebo, M., et al. 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" in J. Nanomat. Volume 2009, ID Articolo 439389, 24 pagine, doi: 10.1155/2009/439389). Le nanoparticelle possono essere sviluppate e coniugate ad anticorpi contenuti in composizioni farmaceutiche per bersagliare cellule. Nanoparticelle per la somministrazione di farmaci sono state descritte anche, per esempio, in US 8257740, o US 8246995.

In certe situazioni, la composizione farmaceutica può essere erogata in un sistema a rilascio controllato. Può essere usata una pompa. Possono essere usati materiali polimerici. Un sistema a rilascio controllato può essere posizionato in prossimità del bersaglio della composizione, richiedendo così solo una frazione della dose sistemica.

Le preparazioni iniettabili possono includere forme di dosaggio per somministrazione intravenosa,

sottocutanea, iniezioni intracutanee, intracraniche, intraperitoneali e intramuscolari, infusioni per gocciolamento, ecc. Queste preparazioni iniettabili possono essere preparate mediante metodi noti pubblicamente. Per esempio, le preparazioni iniettabili possono essere preparate, *per esempio*, sciogliendo, sospendendo o emulsionando l'anticorpo o il suo sale descritto sopra in un mezzo acquoso o un mezzo oleoso sterile convenzionalmente usato per preparazioni iniettabili. Come mezzo acquoso per iniezioni, ci sono, per esempio, soluzione salina fisiologica, una soluzione isotonica contenente glucosio e altri agenti ausiliari, ecc., che possono essere usate in combinazione con un appropriato agente solubilizzante come un alcool (*per esempio*, etanolo), un polialcool (*per esempio*, propilenglicole, polietilenglicole), un tensioattivo non ionico [*per esempio*, polisorbato 80, HCO-50 (poliossietilene (50 mol) addotto di olio di ricino idrogenato)], ecc. Come mezzo oleoso sono impiegati, per esempio, olio di sesamo, olio di soia, ecc., che possono essere usati in combinazione con un agente solubilizzante come benzoato di benzile, alcool benzilico, ecc. L'iniezione così preparata è preferibilmente riempita in una fiala appropriata.

Una composizione farmaceutica descritta nella presente può essere erogata per via sottocutanea o intravenosa con un ago e una siringa standard. Inoltre, rispetto alla somministrazione sottocutanea, un dispositivo di erogazione a penna ha facilmente applicazioni nella somministrazione di una composizione farmaceutica descritta nella presente. Un tale dispositivo di erogazione a penna può essere riutilizzabile o monouso. Un dispositivo di erogazione a penna riutilizzabile generalmente utilizza una cartuccia sostituibile che contiene una composizione farmaceutica. Una volta che tutta la composizione farmaceutica all'interno della cartuccia è stata somministrata e la cartuccia è vuota, la cartuccia vuota può essere facilmente scartata e sostituita con una nuova cartuccia che contiene la composizione farmaceutica. Il dispositivo di erogazione a penna può quindi essere riutilizzato. In un dispositivo di erogazione a penna monouso, non è presente alcuna cartuccia sostituibile. Piuttosto, il dispositivo di erogazione a penna monouso viene pre-riempito con la composizione farmaceutica trattenuta in un serbatoio all'interno del dispositivo. Una volta che il serbatoio viene svuotato della composizione farmaceutica, l'intero dispositivo viene

scartato.

Numerosi dispositivi di erogazione a penna o ad autoiniettore riutilizzabili hanno applicazioni nell'erogazione sottocutanea di una composizione farmaceutica descritta nella presente. Esempi includono, ma certamente non sono limitati a AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Regno Unito), penna DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Svizzera), penna HUMALOG MIX 75/25™, penna HUMALOG™, penna HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II e III (Novo Nordisk, Copenhagen, Danimarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Danimarca), penna BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, e OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Francoforte, Germania), solo per nominarne alcuni. Esempi di dispositivi di erogazione a penna monouso che hanno applicazioni nella somministrazione sottocutanea di una composizione farmaceutica descritta nella presente includono, ma certamente non sono limitati a, penna SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), e KWIKPEN™ (Eli Lilly), l'autoiniettore SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), e PENLET™ (Haselmeier, Stoccarda, Germania), la penna EPIPEN (Dey, L.P.) e HUMIRA™ (Abbott Labs,

Abbott Park, IL), per nominarne alcuni.

Vantaggiosamente, le composizioni farmaceutiche per uso orale o parenterale descritte sopra vengono preparate in forme di dosaggio in una dose unitaria idonea a contenere una dose dei principi attivi. Tali forme di dosaggio in una dose unitaria includono, per esempio, compresse, pillole, capsule, iniezioni (ampolle), supposte, ecc. La quantità dell'anticorpo contenuto è generalmente da circa 5 a circa 500 mg per forma di dosaggio in una dose unitaria; specialmente nella forma di iniezione, si preferisce che l'anticorpo sia contenuto da circa 5 a circa 300 mg e da circa 10 a circa 300 mg per le altre forme di dosaggio.

Usi terapeutici degli anticorpi

Gli anticorpi descritti nella presente sono utili per il trattamento e/o la prevenzione di una malattia o disturbo o condizione associata a C5 e/o per migliorare almeno un sintomo associato a tale malattia, disturbo o condizione. Un anticorpo o suo frammento di legame di antigene descritto nella presente può essere somministrato a una dose terapeutica a un paziente con una malattia o disturbo o condizione associata a C5.

Gli anticorpi descritti nella presente sono utili per

trattare o prevenire un sintomo o indicazione di sindrome emolitica uremica atipica (aHUS). Sintomi e indicazioni di aHUS includono, ma non sono limitati ad, attivazione piastrinica, emolisi, microangiopatia trombotica sistemica (formazione di coaguli di sangue in piccoli vasi sanguigni in tutto il corpo) che porta a ictus, infarto, insufficienza renale e/o morte, malattia renale allo stadio terminale, danno renale permanente, dolore addominale, confusione, edema, affaticamento, nausea/vomito, diarrea, e anemia microangiopatica.

Gli anticorpi descritti nella presente sono utili nel trattamento o nella prevenzione di un sintomo o indicazione di emoglobinuria parossistica notturna (PNH). I sintomi e le indicazioni di PNH includono, ma non sono limitati a, distruzione di globuli rossi, trombosi (inclusa trombosi venosa profonda, embolia polmonare), anemia emolitica intravascolare, scolorimento rosso delle urine, sintomi di anemia come stanchezza, mancanza di respiro e palpitazioni, dolore addominale e difficoltà di deglutizione.

Gli anticorpi descritti nella presente sono utili per trattare o prevenire almeno un sintomo o indicazione di una malattia o disturbo associato a C5 selezionato dal gruppo costituito da disturbi neurologici,

disturbi renali, sclerosi multipla, ictus, sindrome di Guillain Barre, lesione cerebrale traumatica, morbo di Parkinson, disturbi di attivazione del complemento inappropriata o indesiderabile, complicazioni di emodialisi, rigetto di alloinnesto iperacuto, rigetto di xenoinnesto, tossicità indotta da interleuchina-2 durante la terapia con IL-2, disturbi infiammatori, infiammazione di malattie autoimmuni, malattia di Crohn, sindrome da distress respiratorio dell'adulto, lesioni termiche incluse ustioni o congelamento, condizioni di riperfusione post-ischemica, infarto miocardico, sindrome da perdita capillare, obesità, diabete, morbo di Alzheimer, schizofrenia, ictus, epilessia, aterosclerosi, vasculite, pemfigoide bolloso, glomerulopatia C3, glomerulonefrite membranoproliferativa, angioplastica con palloncino, sindrome post-pompa in bypass cardiopolmonare o renale, emodialisi, ischemia renale, riperfusione dell'arteria mesenterica dopo ricostruzione aortica, malattia infettiva o sepsi, disturbi del complesso immunitario e malattie autoimmuni, nefropatia diabetica, sindrome di Alport, insufficienza renale progressiva, malattie renali proteinuriche, lesione da ischemia-rifusione renale, nefrite da lupus,

glomerulopatia, artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico (SLE), nefrite da SLE, nefrite membranoproliferativa, anemia emolitica, neuromielite ottica, trapianto renale, deficit ereditario di CD59, psoriasi e miastenia grave. Gli anticorpi descritti nella presente sono utili per trattare o prevenire almeno un sintomo o indicazione di una malattia o disturbo associato a C5 selezionato dal gruppo costituito da malattia polmonare e disturbi come dispnea, emottisi, ARDS, asma, malattia polmonare ostruttiva cronica (COPD), enfisema, embolia polmonare e infarti, polmonite, malattie da polvere fibrogenica, lesione dovuta a polveri e minerali inerti (*per esempio*, silicio, polvere di carbone, berillio e amianto), fibrosi polmonare, malattie da polvere organica, lesione chimica (dovuta a gas e sostanze chimiche irritanti, *per esempio*, cloro, fosgene, anidride solforica, solfuro di idrogeno, biossido di azoto, ammoniaca e acido cloridrico), lesione da fumo, lesione termica (*per esempio*, ustione, congelamento), asma, allergia, broncocostrizione, polmonite da ipersensibilità, malattie parassitarie, sindrome di Goodpasture, vasculite polmonare, angioedema ereditario, infiammazione associata a complesso.

Gli anticorpi descritti nella presente sono utili per trattare soggetti che soffrono di una malattia oculare come degenerazione maculare senile (AMD), edema maculare diabetico (DME), retinopatia diabetica, angiogenesi oculare (neovascolarizzazione oculare che colpisce il tessuto coroideale, corneale o retinico), atrofia geografica (GA), uveite e neuromielite ottica. Gli anticorpi descritti nella presente possono essere usati per trattare o migliorare almeno un sintomo o indicazione di AMD secca o AMD umida. Gli anticorpi descritti nella presente sono utili per prevenire o rallentare il tasso di perdita della vista. Gli anticorpi descritti nella presente sono utili per ridurre le drusen nell'occhio di un soggetto con AMD secca. Gli anticorpi descritti nella presente sono utili per prevenire o ridurre/rallentare la perdita della vista in un soggetto con AMD.

Uno o più anticorpi descritti nella presente possono essere somministrati per alleviare o prevenire o diminuire la gravità di uno o più dei sintomi o delle condizioni/indicazioni della malattia o del disturbo oculare. Gli anticorpi possono essere usati per migliorare o ridurre la gravità di almeno un sintomo inclusi, ma non limitati a perdita della vista,

distorsione visiva, difficoltà di adattamento a bassi livelli di luce, visione centrale deforme, aumento della nebulosità della visione centrale/complessiva, presenza di drusen (piccoli accumuli di materiale extracellulare che si accumulano sulla retina), cambiamenti pigmentari, visione distorta sotto forma di metamorfopsia, in cui una griglia di linee rette appare ondulata e parti della griglia possono apparire vuote, cambiamenti essudativi (emorragie nell'occhio, essudati duri, fluido subretinico/sub-RPE/intraretinico), lento recupero della funzione visiva dopo esposizione a luce intensa (test da fotostress), atrofia incipiente e geografica, acuità visiva drasticamente decrescente (due livelli o più), *per esempio*, da 20/20 a 20/80, cambiamenti di perimetria di iperacuità preferenziale (per AMD umida), visione offuscata, graduale perdita della visione centrale (per quelli con degenerazione maculare non essudativa, rapida insorgenza di perdita della vista (spesso causata da perdite e sanguinamento di vasi sanguigni anormali in soggetti con degenerazione maculare essudativa, scotomi centrali (ombre o aree di visione mancanti), difficoltà nel discernere i colori, in particolare quelli scuri da quelli scuri e quelli chiari da

quelli chiari, perdita di sensibilità al contrasto, linee rette appaiono curve in una griglia di Amsler. Nella presente è anche contemplato l'uso profilattico di uno o più anticorpi descritti nella presente per soggetti a rischio di sviluppare la degenerazione maculare come soggetti di età superiore ai 50 anni, soggetti con una storia familiare di degenerazione maculare, fumatori e soggetti con obesità, colesterolo alto, malattie cardiovascolari o dieta non sana.

I presenti anticorpi possono essere usati per la preparazione di una composizione farmaceutica o di un medicinale per il trattamento di pazienti che soffrono di una malattia o disturbo associato a C5. I presenti anticorpi possono essere usati come terapia aggiuntiva con qualsiasi altro agente o qualsiasi altra terapia nota agli esperti del ramo utile per trattare o migliorare una malattia o un disturbo associato a C5.

Terapie di combinazione

Terapie di combinazione possono includere un anticorpo anti-C5 descritto nella presente e qualsiasi agente terapeutico aggiuntivo che può essere vantaggiosamente combinato con un anticorpo descritto nella presente, o con un frammento

biologicamente attivo di un anticorpo descritto nella presente. Gli anticorpi descritti nella presente possono essere combinati sinergicamente con uno o più farmaci o terapia usati per trattare una malattia o un disturbo associato a C5. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi descritti nella presente possono essere combinati con un secondo agente terapeutico per migliorare uno o più sintomi di detta malattia.

A seconda della malattia o del disturbo associato a C5, gli anticorpi descritti nella presente possono essere usati in combinazione con uno o più agenti terapeutici aggiuntivi incluso, ma non limitati a, un anticoagulante (*per esempio*, warfarin, aspirina, eparina, fenindione, fondaparinux, idraparinux e inibitori di trombina come argatroban, lepirudina, bivalirudina o dabigatran), un farmaco antinfiammatorio (*per esempio*, corticosteroidi e farmaci antinfiammatori non steroidei), un antipertensivo (*per esempio*, un inibitore dell'enzima di conversione dell'angiotensina), un agente immunosoppressivo (*per esempio*, vincristina, ciclosporina A, o metotrexato), un agente fibrinolitico (*per esempio*, ancrod, acido ϵ -amminocaproico, antiplasmina-ai, prostaciclina, e

defibrotide), un agente di abbassamento di lipidi come un inibitore di idrossimetilglutaril CoA reduttasi, un agente anti-C20D, come rituximab, un agente anti-TNF come infliximab, un agente anti-epilettico (per esempio, solfato di magnesio), un inibitore di C3, o un agente anti-trombotico.

Il secondo agente terapeutico può essere un altro anticorpo per la proteina C5. Nella presente è contemplato l'uso di una combinazione ("cocktail") di anticorpi con ampia neutralizzazione o attività inibitoria contro C5. Gli anticorpi non concorrenti possono essere combinati e somministrati a un soggetto che ne ha bisogno. Gli anticorpi comprendenti la combinazione possono legarsi a distinti epitopi non sovrapposti sulla proteina. Gli anticorpi che comprendono la combinazione possono bloccare il legame di C5 alla convertasi C5 e/o possono prevenire/inibire il clivaggio di C5 in C5a e C5b. Il secondo anticorpo può possedere un'emivita più lunga nel siero umano.

Come usato nella presente, il termine "in combinazione con" significa che gli uno o più componenti terapeuticamente attivi aggiuntivi possono essere somministrati prima, contemporaneamente a, o dopo la somministrazione dell'anticorpo anti-C5

descritto nella presente. Il termine "in combinazione con" include anche la somministrazione sequenziale o concomitante di un anticorpo anti-C5 e un secondo agente terapeutico.

L'uno o più componenti terapeuticamente attivi aggiuntivi possono essere somministrati a un soggetto prima della somministrazione di un anticorpo anti-C5 descritto nella presente. Ad esempio, un primo componente può essere considerato essere somministrato "prima" di un secondo componente se il primo componente viene somministrato 1 settimana prima, 72 ore prima, 60 ore prima, 48 ore prima, 36 ore prima, 24 ore prima, 12 ore prima, 6 ore prima, 5 ore prima, 4 ore prima, 3 ore prima, 2 ore prima, 1 ora prima, 30 minuti prima, 15 minuti prima, 10 minuti prima, 5 minuti prima o meno di 1 minuto prima della somministrazione del secondo componente. L'uno o più componenti terapeuticamente attivi aggiuntivi possono essere somministrati a un soggetto dopo la somministrazione di un anticorpo anti-C5 descritto nella presente. Per esempio, un primo componente può essere considerato essere somministrato "dopo" un secondo componente se il primo componente viene somministrato 1 minuto dopo, 5 minuti dopo, 10 minuti dopo, 15 minuti dopo, 30 minuti dopo, 1 ora dopo, 2

ore dopo, 3 ore dopo, 4 ore dopo, 5 ore dopo, 6 ore dopo, 12 ore dopo, 24 ore dopo, 36 ore dopo, 48 ore dopo, 60 ore dopo, 72 ore dopo la somministrazione del secondo componente. L'uno o più componenti terapeuticamente attivi aggiuntivi possono essere somministrati a un soggetto contemporaneamente alla somministrazione di un anticorpo anti-C5 descritto nella presente. La somministrazione "contemporanea", ai fini della presente divulgazione, include, per esempio, la somministrazione di un anticorpo anti-C5 e di un componente terapeuticamente attivo aggiuntivo a un soggetto in una singola forma di dosaggio, o in forme di dosaggio separate somministrate al soggetto entro circa 30 minuti o meno tra loro. Se somministrata in forme di dosaggio separate, ciascuna forma di dosaggio può essere somministrata attraverso la stessa via (per esempio, sia l'anticorpo anti-C5 che il componente terapeuticamente attivo aggiuntivo possono essere somministrati per via intravenosa, ecc.); in alternativa, ciascuna forma di dosaggio può essere somministrata attraverso una via differente (per esempio, l'anticorpo anti-C5 può essere somministrato per via intravenosa e il componente terapeuticamente attivo aggiuntivo può essere somministrato per via orale). In ogni caso, la

somministrazione dei componenti in un singolo dosaggio da, in forme di dosaggio separate mediante la stessa via, o in forme di dosaggio separate mediante vie differenti sono tutti considerati "somministrazione contemporanea", ai fini della presente divulgazione. Ai fini della presente divulgazione, la somministrazione di un anticorpo anti-C5 "prima di", "contemporaneamente a", o "dopo" (come tali termini sono definiti qui sopra) la somministrazione di un componente terapeuticamente attivo aggiuntivo è considerata la somministrazione di un anticorpo anti-C5 "in combinazione con" un componente terapeuticamente attivo aggiuntivo.

La presente divulgazione include composizioni farmaceutiche in cui un anticorpo anti-C5 descritto nella presente è co-formulato con uno o più degli uno o più componenti terapeuticamente attivi aggiuntivi come descritto altrove nella presente.

Regimi di somministrazione

Una singola dose di un anticorpo anti-C5 descritto nella presente (o una composizione farmaceutica comprendente una combinazione di un anticorpo anti-C5 e qualsiasi degli agenti terapeuticamente attivi aggiuntivi menzionati nella presente) può essere somministrata a un soggetto che ne ha bisogno.

Molteplici dosi di un anticorpo anti-C5 (o una composizione farmaceutica comprendente una combinazione di un anticorpo anti-C5 e qualsiasi degli agenti terapeuticamente attivi aggiuntivi menzionati nella presente) possono essere somministrate a un soggetto nel corso di un periodo di tempo definito. I metodi secondo questo aspetto comprendono la somministrazione in sequenza a un soggetto di molteplici dosi di un anticorpo anti-C5 descritto nella presente. Come usata nella presente, "somministrare sequenzialmente" significa che ciascuna dose di anticorpo anti-C5 viene somministrata al soggetto a un differente punto nel tempo, *per esempio*, in giorni differenti separati da un intervallo predeterminato (*per esempio*, ore, giorni, settimane o mesi). La presente divulgazione include metodi che comprendono la somministrazione sequenziale al paziente di una singola dose iniziale di un anticorpo anti-C5, seguita da una o più dosi secondarie dell'anticorpo anti-C5, e facoltativamente seguita da una o più dosi terziarie dell'anticorpo anti-C5.

I termini "dose iniziale", "dosi secondarie", e "dosi terziarie", si riferiscono alla sequenza temporale di somministrazione dell'anticorpo anti-C5 descritta

nella presente. Così, la "dose iniziale" è la dose che è somministrata all'inizio del regime di trattamento (anche indicata come "dose basale"); le "dosi secondarie" sono le dosi che vengono somministrate dopo la dose iniziale; e le "dosi terziarie" sono le dosi che vengono somministrate dopo le dosi secondarie. Le dosi iniziali, secondarie e terziarie possono tutte contenere la stessa quantità di anticorpo anti-C5, ma generalmente possono differire l'una dall'altra in termini di frequenza di somministrazione. In alcuni aspetti, tuttavia, la quantità di anticorpo anti-C5 contenuta nelle dosi iniziali, secondarie e/o terziarie varia l'una dall'altra (*per esempio*, regolata verso l'alto o verso il basso come appropriato) durante il corso del trattamento. In certi aspetti, due o più (*per esempio* 2, 3, 4, o 5) dosi sono somministrate all'inizio del regime di trattamento come "dosi di carico" seguite da successive dosi che sono somministrate su una base meno frequente (*per esempio*, "dosi di mantenimento").

Ciascuna dose secondaria e/o terziaria può essere somministrata da 1 a 48 ore (*per esempio*, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½,

16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, o più) dopo la dose immediatamente precedente. L'espressione "la dose immediatamente precedente", come usata nella presente, indica, in una sequenza di molteplici somministrazioni, la dose di anticorpo anti-C5 che viene somministrata a un paziente prima della somministrazione della dose immediatamente successiva nella sequenza senza dosi intermedie.

I metodi secondo questo aspetto possono comprendere la somministrazione a un paziente di qualsiasi numero di dosi secondarie e/o terziarie di un anticorpo anti-C5. Per esempio, in certi aspetti, al paziente è somministrata solo una singola dose secondaria. In altri aspetti, due o più (*per esempio, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o più*) dosi secondarie sono somministrate al paziente. Allo stesso modo, in alcuni aspetti, al paziente è somministrata solo una singola dose terziaria. In altri aspetti, due o più (*per esempio, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o più*) dosi terziarie sono somministrate al paziente.

La frequenza con la quale le dosi secondarie e/o terziarie sono somministrate a un paziente può variare durante il corso del regime di trattamento. La frequenza di somministrazione può anche essere

regolata durante il corso del trattamento da parte di un medico in base alle necessità del singolo paziente dopo un esame clinico.

Usi diagnostici degli anticorpi

Gli anticorpi anti-C5 della presente invenzione possono essere usati per rilevare e/o misurare C5 in un campione, *per esempio*, per scopi diagnostici. Alcuni aspetti contemplano l'uso di uno o più anticorpi della presente invenzione in saggi per rilevare una malattia o un disturbo associato a C5. Saggi diagnostici esemplificativi per C5 possono comprendere, *per esempio*, mettere a contatto un campione, ottenuto da un paziente, con un anticorpo anti-C5 dell'invenzione, in cui l'anticorpo anti-C5 è etichettato con una etichetta o molecola reporter rilevabile o usato come un ligando di cattura per isolare selettivamente C5 da campioni di pazienti. In alternativa, un anticorpo anti-C5 non etichettato può essere usato in applicazioni diagnostiche in combinazione con un anticorpo secondario che è esso stesso marcato in modo rilevabile. L'etichetta rivelabile o la molecola reporter può essere un radioisotopo, come ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , or ^{125}I ; un gruppo funzionale fluorescente o chemiluminescente, come fluoresceina isotiocianato o rodamina; o un enzima

come fosfatasi alcalina, β -galattosidasi, perossidasi di rafano o luciferasi. Specifici saggi esemplificativi che possono essere usati per rilevare o misurare C5 in un campione includono saggi immuno-assorbenti legati ad un enzima (ELISA), saggio radioimmunologico (RIA), e la selezione di cellule attivata con fluorescenza (FACS).

I campioni che possono essere usati nei saggi diagnostici di C5 includono qualsiasi campione di tessuto o fluido ottenibile da un paziente, che contiene quantità rilevabili di proteina C5, o suoi frammenti, in condizioni normali o patologiche. Generalmente, i livelli di proteina C5 in un particolare campione ottenuto da un paziente sano (*per esempio*, un paziente non affetto da una malattia associata a C5) sono misurati per stabilire inizialmente un livello basale, o standard, di C5. Questo livello basale di C5 può quindi essere confrontato con i livelli di C5 misurati in campioni ottenuti da individui sospettati di avere una condizione associata a C5, o sintomi associati a tale condizione.

Gli anticorpi specifici per la proteina C5 possono non contenere nessuna etichetta o gruppo funzionale aggiuntivo, o possono contenere una etichetta o

gruppo funzionale N-terminale o C-terminale. In un aspetto, l'etichetta o gruppo funzionale è biotina. In un saggio di legame, la posizione di una etichetta (se presente) può determinare l'orientamento del peptide rispetto alla superficie su cui il peptide è legato. Per esempio, se una superficie è rivestita con avidina, un peptide contenente una biotina N-terminale è orientato in modo tale che la porzione C-terminale del peptide sia distale alla superficie.

ESEMPI

I seguenti esempi sono illustrativi ma non limitano la portata delle rivendicazioni.

Esempio 1: Generazione di anticorpi umani per la proteina fattore del complemento 5 (C5)

Gli anticorpi umani verso la proteina C5 sono stati generati in un topo VELOCIMMUNE® comprendente DNA codificante le regioni variabili di catena pesante e leggera kappa di immunoglobulina umana. I topi sono stati immunizzati con proteina C5 umana purificata nel siero (Calbiochem Cat #20-4888).

La risposta immunitaria anticorpale è stata monitorata mediante un saggio immunologico C5 specifico. Quando è stata ottenuta una risposta immunitaria desiderata, gli splenociti sono stati raccolti e fusi con cellule di mieloma di topo per

preservarne la vitalità e formare linee cellulari di ibridoma. Le linee cellulari di ibridoma sono state sottoposte a screening e selezionate per identificare le linee cellulari che producono anticorpi specifici per C5. Le linee cellulari sono state utilizzate per ottenere diversi anticorpi chimerici anti-C5 (ovvero, anticorpi che possiedono domini variabili umani e domini costanti di topo); anticorpi esemplificativi generati in questo modo sono stati indicati come H2M11683N e H2M11686N.

Gli anticorpi anti-C5 sono stati anche isolati direttamente dalle cellule B di topo antigene-positivo senza fusione alle cellule di mieloma, come descritto nel brevetto U.S. 7582298. Usando questo metodo, sono stati ottenuti diversi anticorpi anti-C5 completamente umani (ovvero, anticorpi che possiedono domini variabili umani e domini costanti umani); anticorpi esemplificativi generati in questo modo sono stati indicati come H4H12159P, H4H12161P, H4H12163P, H4H12164P, H4H12166P, H4H12167P, H4H12168P, H4H12169P, H4H12170P, H4H12171P, H4H12175P, H4H12176P2, H4H12177P2 e H4H12183P2.

Le proprietà biologiche degli anticorpi esemplificativi generati secondo i metodi di questo Esempio sono descritte in dettaglio negli Esempi

esposti di seguito.

Esempio 2: Sequenze amminoacidiche e nucleotidiche di regione variabile di catena pesante e leggera

La Tabella 1 espone gli identificatori delle sequenze amminoacidiche delle regioni variabili di catena pesante e leggera e delle CDR di anticorpi anti-C5 selezionati come divulgati nella presente.

Tabella 1: Identificatori di sequenze amminoacidiche

Designazione anticorpo	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H2M11683N	2	4	6	8	10	12	14	16
H2M11686N	18	20	22	24	26	28	30	32
H4H12159P	34	36	38	40	42	44	46	48
H4H12161P	50	52	54	56	58	60	62	64
H4H12163P	66	68	70	72	74	76	78	80
H4H12164P	82	84	86	88	90	92	94	96
H4H12166P	98	100	102	104	106	108	110	112
H4H12166P2	98	100	102	104	114	116	118	120
H4H12166P3	122	124	126	128	106	108	110	112
H4H12166P4	98	100	102	104	130	132	134	136
H4H12166P5	138	140	142	144	106	108	110	112
H4H12166P6	146	148	150	152	106	108	110	112
H4H12166P7	122	124	126	128	130	132	134	136
H4H12166P8	146	148	150	152	114	116	118	120
H4H12166P9	146	148	150	152	130	132	134	136
H4H12166P10	138	140	142	144	130	132	134	136
H4H12167P	154	156	158	160	162	164	166	168

H4H12168P	170	172	174	176	178	180	182	184
H4H12169P	186	188	190	192	194	196	198	200
H4H12170P	202	204	206	208	210	212	214	216
H4H12171P	218	220	222	224	226	228	230	232
H4H12175P	234	236	238	240	242	244	246	248
H4H12176P2	250	252	254	256	258	260	262	264
H4H12177P2	266	268	270	272	258	260	262	264
H4H12183P2	274	276	278	280	282	284	286	288
H2M11682N	290	292	294	296	298	300	302	304
H2M11684N	306	308	310	312	314	316	318	320
H2M11694N	322	324	326	328	330	332	334	336
H2M11695N	338	340	342	344	346	348	350	352

Gli identificatori di sequenze di acidi nucleici corrispondenti sono indicati nella Tabella 2.

Tabella 2: Identificatori di sequenze di acidi nucleici

Designazione anticorpo	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H2M11683N	1	3	5	7	9	11	13	15
H2M11686N	17	19	21	23	25	27	29	31
H4H12159P	33	35	37	39	41	43	45	47
H4H12161P	49	51	53	55	57	59	61	63
H4H12163P	65	67	69	71	73	75	77	79
H4H12164P	81	83	85	87	89	91	93	95
H4H12166P	97	99	101	103	105	107	109	111
H4H12166P2	97	99	101	103	113	115	117	119
H4H12166P3	121	123	125	127	105	107	109	111
H4H12166P4	97	99	101	103	129	131	133	135

H4H12166P5	137	139	141	143	105	107	109	111
H4H12166P6	145	147	149	151	105	107	109	111
H4H12166P7	121	123	125	127	129	131	133	135
H4H12166P8	145	147	149	151	113	115	117	119
H4H12166P9	145	147	149	151	129	131	133	135
H4H12166P10	137	139	141	143	129	131	133	135
H4H12167P	153	155	157	159	161	163	165	167
H4H12168P	169	171	173	175	177	179	181	183
H4H12169P	185	187	189	191	193	195	197	199
H4H12170P	201	203	205	207	209	211	213	215
H4H12171P	217	219	221	223	225	227	229	231
H4H12175P	233	235	237	239	241	243	245	247
H4H12176P2	249	251	253	255	257	259	261	263
H4H12177P2	265	267	269	271	257	259	261	263
H4H12183P2	273	275	277	279	281	283	285	287
H2M11682N	289	291	293	295	297	299	301	303
H2M11684N	305	307	309	311	313	315	317	319
H2M11694N	321	323	325	327	329	331	333	335
H2M11695N	337	339	341	343	345	347	349	351

Gli anticorpi sono tipicamente indicati nella presente secondo la seguente nomenclatura: Il prefisso Fc (per esempio "H4H," "H2M," ecc.), seguito da un identificatore numerico (per esempio "11686," "12166," "12183," ecc., come mostrato nella Tabella 2), seguito da un suffisso "P," "P2," o "N". Pertanto, secondo questa nomenclatura, un anticorpo può essere indicato nella presente come, per esempio, "H2M11686N," "H4H12183P2," "H4H12168P," ecc. I

prefissi H4H e H2M sulle designazioni degli anticorpi usati nella presente indicano il particolare isotipo della regione Fc dell'anticorpo. Per esempio, un anticorpo "H4H" ha un Fc di IgG4 umana comprendente una mutazione da serina a prolina nella regione cerniera (S108P) per promuovere la stabilizzazione del dimero, e un anticorpo "H2M" ha un Fc di IgG2 di topo (isotipo a o b) (tutte le regioni variabili sono completamente umane come indicato dalla prima "H" nella designazione dell'anticorpo). Come è apprezzato da un esperto del ramo di ordinaria competenza, un anticorpo avente un particolare isotipo di Fc può essere convertito in un anticorpo con un differente isotipo di Fc (*per esempio*, un anticorpo con un Fc di IgG1 di topo può essere convertito in un anticorpo con una IgG4 umana, ecc.), ma in ogni caso, i domini variabili (incluse le CDR) - che sono indicati dagli identificatori numerici mostrati nella Tabella 2 - rimangono gli stessi, e si prevede che le proprietà di legame all'antigene siano identiche o sostanzialmente simili indipendentemente dalla natura del dominio Fc.

In certe forme di realizzazione, anticorpi selezionati con un Fc di IgG1 di topo sono stati convertiti in anticorpi con Fc di IgG4 umana. In una

forma di realizzazione, il dominio Fc di IgG4 comprende 2 o più cambiamenti di amminoacidi come divulgato in US20100331527.

Per generare anticorpi mutati, vari residui nelle regioni di determinazione di complementarità (CDR) di H4H12166P sono stati mutati in istidina per generare 9 anticorpi mutati, identificati come da H4H12166P2 a H4H12166P10. È stato dimostrato che le mutazioni di istidina nelle CDR conferiscono dipendenza dal pH del legame con l'antigene bersaglio, portando a una migliore farmacocinetica (Igawa *et al.* 2010, *Nat. Biotechnol.* 28: 1203-1207).

Costrutti di controllo usati negli Esempi seguenti

I seguenti costrutti di controllo (anticorpi anti-C5) sono stati inclusi negli esperimenti divulgati nella presente, per scopi comparativi: "Comparatore 1", un anticorpo monoclonale contro C5 umano avente le sequenze di V_H/V_L dell'anticorpo "h5G1.1" secondo il brevetto US N. 6,355,245 (Alexion Pharmaceuticals, Inc.); e "Comparatore 2", un anticorpo monoclonale umano contro C5 umano avente le sequenze di V_H/V_L dell'anticorpo "8109" secondo la pubblicazione di domanda di brevetto US N. 2013/0022615 (Novartis).

Esempio 3: Legame di anticorpi a C5 come determinato mediante risonanza plasmonica di superficie

Le costanti di dissociazione all'equilibrio (valori K_D) per il legame di C5 agli anticorpi anti-C5 purificati sono state determinate usando un saggio di biosensore di risonanza plasmonica di superficie in tempo reale su uno strumento Biacore T200. La superficie del sensore Biacore è stata derivatizzata mediante accoppiamento amminico con un anticorpo monoclonale anti-Fc umano di topo (GE Healthcare, # BR-1008-39) per catturare gli anticorpi anti-C5 espressi con regioni costanti di Fc umano. Gli studi di legame con Biacore sono stati condotti in tampone di corsa HBST (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, tensioattivo P20 0,05% v/v). C5 umano è stato ottenuto da una fonte commerciale (EMD). Altri reagenti di C5 sono stati espressi con un tag myc-myc-myc-esaistidina C-terminale (successivamente indicato come C5-mmh). Sono stati espressi anche reagenti C5-mmh umani contenenti mutazioni puntiformi di istidina e cisteina all'arginina 885 (successivamente indicati come C5 R885H-mmh e C5 R885C-mmh, rispettivamente). Diverse concentrazioni di C5 umano, C5 umano R885H-mmh (SEQ ID No: 356), C5 R885C-mmh umano (SEQ ID No: 357) e C5-mmh di scimmia (SEQ ID No: 358) (che vanno da 100 nM a 1,23 nM, diluizioni 3 volte) preparate in tampone di corsa

HBST sono state iniettate sulla superficie dell'anticorpo anti-C5 catturato a una portata di 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. L'associazione di tutti i reagenti C5 a ciascuno degli anticorpi monoclonali catturati è stata monitorata per 3 minuti e la loro dissociazione in tampone di corsa HBST è stata monitorata per 8 minuti. Tutti gli esperimenti di cinetica di legame sono stati eseguiti a 25°C o 37°C. Le costanti di velocità di associazione (k_a) e dissociazione (k_d) cinetica sono state determinate adattando i sensorigrammi in tempo reale a un modello di legame 1:1 usando il software di adattamento di curve Scrubber 2.0c. Le costanti di equilibrio di dissociazione (K_D) e le emivite ($t_{1/2}$) dissociative del legame sono state calcolate dalle costanti di velocità cinetiche come:

$$K_D (M) = k_d/k_a \quad \text{e} \quad t_{1/2} (\text{min}) = \ln 2 / (60 \times k_d)$$

I parametri cinetici di legame per il legame di C5 umano agli anticorpi anti-C5 a 25°C e 37°C sono mostrati nelle Tabelle 3 e 4.

Tabella 3: Parametri cinetici di legame di anticorpi monoclonali anti-C5 che si legano a C5 umano a 25°C

Anticorpo	Quantità di anticorpo catturato (RU)	C5 umano 100nM legato (RU)	k_a	k_d	KD	$t_{1/2}$
			(1/MS)	(1/s)	(M)	(min)
)

H4H11683N	231	439	4,17E+05	5,14E-05	1,23E-10	225
H4H12171P	51	64	1,49E+05	8,16E-05	5,49E-10	142
H4H12161P	38	64	2,58E+05	4,37E-05	1,70E-10	264
H4H12176P2	50	96	3,36E+05	6,75E-05	2,01E-10	171
H4H12163P	51	108	6,43E+05	2,08E-04	3,24E-10	55
H4H 12167P	52	116	1,09E+06	1,31E-04	1,21E-10	88
H4H12175P	51	100	2,16E+05	1,96E-04	9,10E-10	59
H4H12159P	53	118	9,75E+05	7,13E-05	7,31E-11	162
H4H12164P	52	103	2,92E+05	8,84E-05	3,02E-10	131
H4H12168P	50	113	4,23E+05	4,75E-05	1,12E-10	243
H4H12169P	51	18	2,24E+05	4,40E-04	1,96E-09	26
H4H11686N	200	341	2,20E+05	3,31E-05	1,50E-10	349
H4H12170P	51	119	5,25E+05	6,79E-05	1,29E-10	170
H4H12177P2	47	60	6,56E+04	6,29E-05	9,59E-10	184
H4H12183P2	46	50	1,66E+05	2,70E-05	1,63E-10	427
H4H12166P	53	105	6,42E+05	1,10E-04	1,71E-10	105
H4H12166P2	53	95	8,26E+05	3,61E-04	4,38E-10	32
H4H12166P3	59	124	4,03E+05	4,65E-04	1,15E-09	25
H4H12166P4	49	92	4,46E+05	1,76E-04	3,95E-10	66
H4H12166P5	59	110	2,85E+05	3,28E-04	1,15E-09	35
H4H12166P6	64	131	4,89E+05	1,84E-04	3,75E-10	63
H4H12166P7	50	92	2,74E+05	1,01E-03	3,67E-09	11
H4H12166P8	50	91	4,84E+05	6,86E-04	1,42E-09	17
H4H12166P9	52	100	3,32E+05	2,64E-04	7,94E-10	44
H4H12166P10	49	69	1,57E+05	1,32E-03	8,38E-09	9
Comparatore 1	232	250	9,69E+04	1,46E-04	1,51E-09	79
Comparatore 2	117	170	2,62E+05	2,39E-04	9,12E-10	48

Tabella 4: Parametri cinetici di legame di anticorpi monoclonali anti-C5 che si legano a C5 umano a 37°C

Anticorpo	Quantità di anticorpo catturato (RU)	C5 umano 100 nM legato (RU)	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
			(1/MS)	(1/s)	(M)	(min)
H4H11683N	257	492	4,54E+05	2,41E-04	5,32E-10	48
H4H12171P	59	58	1,22E+05	7,62E-04	6,27E-09	15
H4H12161P	40	66	1,16E+05	1,15E-04	9,90E-10	101
H4H12176P2	38	71	1,47E+05	2,34E-04	1,59E-09	49
H4H12163P	65	139	9,11E+05	6,65E-04	7,29E-10	17
H4H12167P	75	153	1,29E+06	3,81E-04	2,95E-10	30
H4H12175P	74	132	2,96E+05	6,37E-04	2,15E-09	18
H4H12159P	70	145	1,04E+06	1,07E-04	1,03E-10	108
H4H12164P	66	140	3,96E+05	1,28E-04	3,23E-10	90
H4H12168P	34	12	2,50E+04	4,64E-04	1,85E-08	25
H4H12169P	59	65	1,15E+05	3,52E-04	3,06E-09	33
H4H11686N	206	406	3,33E+05	1,56E-04	4,69E-10	74
H4H12170P	34	55	2,97E+05	4,15E-04	1,40E-09	28
H4H12177P2	41	37	4,42E+04	5,78E-04	1,31E-08	20
H4H12183P2	29	30	4,30E+04	2,50E-04	5,81E-09	46
H4H12166P	69	127	8,80E+05	2,30E-04	2,62E-10	50
H4H12166P2	68	110	9,50E+05	1,23E-03	1,29E-09	9
H4H12166P3	86	147	6,12E+05	1,27E-03	2,07E-09	9
H4H12166P4	63	108	5,05E+05	4,69E-04	9,30E-10	25
H4H12166P5	76	129	4,40E+05	1,22E-03	2,77E-09	9
H4H12166P6	90	157	5,42E+05	4,74E-04	8,75E-10	24
H4H12166P7	64	105	3,49E+05	2,58E-03	7,39E-09	4
H4H12166P8	65	98	6,75E+05	2,09E-03	3,10E-09	6
H4H12166P9	76	122	3,75E+05	6,39E-04	1,70E-09	18
H4H12166P10	64	82	2,27E+05	3,14E-03	1,38E-08	4
Comparatore 1	185	246	1,47E+05	5,30E-04	3,61E-09	22

Comparatore 2	119	205	2,85E+05	6,57E-04	2,30E-10	18
---------------	-----	-----	----------	----------	----------	----

Il legame di C5-mmh di scimmia agli anticorpi anti-C5 a 25°C e 37°C è mostrato nelle Tabelle 5 e 6.

Tabella 5: Parametri cinetici di legame di anticorpi monoclonali anti-C5 che si legano a C5-mmh di scimmia a 25°C

Anticorpo	Quantità di anticorpo catturato (RU)	C5-mmh scimmia 100nM Legato (RU)	k_a (1/MS)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H11683N	228	403	3,86E+05	2,47E-04	6,40E-10	47
H4H12171P	51	17	4,60E+04	2,26E-04	4,92E-09	51
H4H12161P	38	45	6,33E+04	2,48E-05	3,92E-10	465
H4H12176P2	50	69	1,82E+05	5,88E-05	3,22E-10	196
H4H12163P	50	98	3,11E+05	7,75E-04	2,49E-09	15
H4H12167P	52	111	4,19E+05	1,32E-04	3,15E-10	88
H4H12175P	51	59	6,42E+04	1,65E-03	2,57E-08	7
H4H12159P	53	116	3,54E+05	4,69E-05	1,33E-10	246
H4H12164P	51	66	1,27E+05	1,53E-03	1,20E-08	8
H4H12168P	50	86	1,73E+05	1,14E-04	6,60E-10	101
H4H12169P	51	22	1,64E+05	4,55E-03	2,78E-08	3
H4H11686N	196	247	1,57E+05	4,89E-04	3,11E-09	24
H4H12170P	51	92	2,62E+05	5,21E-05	1,99E-10	222
H4H12177P2	47	32	4,62E+04	9,92E-04	2,15E-08	12
H4H12183P2	47	23	4,88E+04	4,94E-04	1,01E-08	23
H4H12166P	52	90	2,05E+05	1,06E-03	5,15E-09	11
H4H12166P2	53	71	3,00E+05	3,16E-03	1,05E-08	4
H4H12166P3	59	72	1,68E+05	4,47E-03	2,66E-08	3
H4H12166P4	49	69	2,10E+05	1,78E-03	8,50E-09	6

H4H12166P5	59	56	1,44E+05	3,46E-03	2,40E-08	3
H4H12166P6	64	94	2,39E+05	2,66E-03	1,11E-08	4
H4H12166P7	50	36	1,36E+05	6,33E-03	4,65E-08	2
H4H12166P8	50	47	2,31E+05	4,99E-03	2,16E-08	2
H4H12166P9	52	55	1,70E+05	3,18E-03	1,87E-08	4
H4H12166P10	49	15	9,56E+04	6,16E-03	6,44E-08	2
Comparatore 1*	228	11	N/D	N/D	3,11E-07	N/D

N/A= Non Disponibile; *SS= analisi allo stato stazionario

Tabella 6: Parametri cinetici di legame di anticorpi monoclonali anti-C5 che si legano a C5-mmh di scimmia a 37°C

Anticorpo	Quantità di anticorpo catturato (RU)	C5-mmh di scimmia 100 nM legato (RU)	k_a	k_d	KD	$t_{1/2}$
			(1/Ms)	(1/s)	(M)	(min)
H4H11683N	192	303	5,35E+05	1,15E-03	2,16E-09	10
H4H12171P	59	78	5,56E+05	1,03E-03	1,85E-09	11
H4H12161P	41	53	1,34E+05	7,45E-04	5,56E-09	16
H4H12176P2	36	47	1,35E+05	1,29E-03	9,60E-09	9
H4H12163P	64	129	3,90E+05	1,25E-03	3,20E-09	9
H4H12167P	74	146	5,37E+05	2,89E-04	5,39E-10	40
H4H12175P	74	74	1,77E+05	2,76E-03	1,56E-08	4
H4H12159P	70	137	4,12E+05	5,50E-05	1,33E-10	210
H4H12164P	65	99	1,86E+05	1,17E-03	6,30E-09	10
H4H12168P	34	29	5,33E+04	6,76E-04	1,27E-08	17
H4H12169P	59	64	2,51E+05	3,61E-03	1,43E-08	3
H4H11686N	145	195	2,33E+05	2,07E-03	8,88E-09	6
H4H12170P	34	60	5,21E+05	8,71E-04	1,67E-09	13

H4H12177P2	41	27	1,50E+05	7,17E-03	4,77E-08	2
H4H12183P2	28	13	5,40E+04	6,37E-03	1,18E-07	2
H4H12166P	68	110	2,19E+05	1,87E-03	8,55E-09	6
H4H12166P2	68	83	3,93E+05	2,97E-03	7,56E-09	4
H4H12166P3	85	92	2,23E+05	2,92E-03	1,31E-08	4
H4H12166P4	62	80	2,23E+05	1,83E-03	8,20E-09	6
H4H12166P5	75	70	1,50E+05	3,13E-03	2,09E-08	4
H4H12166P6	90	112	2,53E+05	2,32E-03	9,18E-09	5
H4H12166P7	63	48	1,25E+05	2,41E-03	1,93E-08	5
H4H12166P8	64	53	2,03E+05	2,69E-03	1,33E-08	4
H4H12166P9	75	69	1,81E+05	2,61E-03	1,44E-08	4
H4H12166P10	63	24	6,60E+04	2,79E-03	4,22E-08	4
Comparatore 1	132	4	NB	NB	NB	NB

Il legame di C5 R885H-mmh umano e di C5 R885C-mmh umano agli anticorpi anti-C5 a 25°C è mostrato rispettivamente nelle Tabelle 7 e 8.

Tabella 7: Parametri cinetici di legame di anticorpi monoclonali anti-C5 che si legano a C5 R885H-mmh umano a 25°C

Anticorpo	Quantità di anticorpo catturato (RU)	C5 R885H-mmh umano 100nM legato (RU)	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
			(1/MS)	(1/s)	(M)	(min)
H4H11683N	183	118	5,26E+05	2,46E-04	4,68E-10	47
H4H12171P	119	51	6,59E+05	1,42E-04	2,16E-10	81
H4H12161P	105	199	8,36E+04	8,32E-05	9,96E-10	139
H4H12176P2	170	65	1,78E+05	2,17E-04	1,22E-09	53
H4H12163P	111	214	6,72E+05	4,34E-04	6,46E-10	27

H4H12167P	93	187	6,89E+05	2,98E-04	4,33E-10	39
H4H12175P	104	207	1,81E+05	1,98E-03	1,09E-08	6
H4H12159P	101	177	7,06E+05	1,76E-04	2,50E-10	66
H4H12164P	143	295	1,58E+05	1,87E-04	1,19E-09	62
H4H12168P	138	197	5,29E+04	2,14E-04	4,05E-09	54
H4H12169P	116	173	4,84E+05	7,09E-05	1,47E-10	163
H4H11686N	145	259	2,16E+05	1,06E-04	4,91E-10	109
H4H12170P	244	442	4,09E+05	1,61E-04	3,94E-10	72
H4H12177P2	137	232	1,48E+05	5,92E-04	4,01E-09	20
H4H12183P2	158	99	3,77E+04	4,37E-05	1,16E-09	264
H4H12166P	188	366	5,28E+05	2,12E-04	4,02E-10	54
Comparatore 1	87	11	NB	NB	NB	NB
Comparatore 2	118	249	1,08E+06	6,53E-04	6,06E-10	18

Tabella 8: Parametri cinetici di legame di anticorpi monoclonali anti-C5 che si legano a C5 R885C-mmh umano a 25°C

Anticorpo	Quantità di anticorpo catturato (RU)	C5 R885C-mmh umano 100 nM legato (RU)	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
			(1/MS)	(1/s)	(M)	(min)
H4H11683N	174	116	4,99E+05	2,39E-04	4,79E-10	48
H4H12171P	109	51	3,79E+05	1,39E-04	3,66E-10	83
H4H12161P	103	147	1,30E+05	8,71E-05	6,72E-10	133
H4H12176P2	164	63	1,07E+05	2,18E-04	2,03E-09	53
H4H12163P	110	211	5,04E+05	4,32E-04	8,58E-10	27
H4H12167P	85	163	7,11E+05	2,94E-04	4,13E-10	39
H4H12175P	99	128	8,18E+04	1,55E-02	1,90E-07	1
H4H12159P	93	168	5,86E+05	1,69E-04	2,89E-10	68
H4H12164P	139	249	1,53E+05	1,82E-04	1,19E-09	63
H4H12168P	128	144	6,09E+04	1,99E-04	3,27E-09	58

H4H12169P	108	168	2,78E+05	6,99E-05	2,51E-10	165
H4H11686N	143	253	1,78E+05	9,49E-05	5,34E-10	122
H4H12170P	244	427	3,57E+05	1,60E-04	4,47E-10	72
H4H12177P2	138	177	1,00E+05	1,32E-03	1,32E-08	9
H4H12183P2	158	80	2,99E+04	2,20E-05	7,37E-10	525
H4H12166P	188	356	4,26E+05	2,07E-04	4,87E-10	56
Comparatore 1	87	9	NB	NB	NB	NB
Comparatore 2	117	241	1,17E+06	6,19E-04	5,30E-10	19

Il legame di C5 R885H-mmh umano e di C5 R885C-mmh umano agli anticorpi anti-C5 a 37°C è mostrato rispettivamente nelle Tabelle 9 e 10.

Tabella 9: Parametri cinetici di legame di anticorpi monoclonali anti-C5 che si legano a C5 R885H-mmh umano a 37°C

Anticorpo	Quantità di anticorpo catturato (RU)	C5 R885H-mmh umano 100 nM	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
		Legato (RU)	(1/MS)	(1/s)	(M)	(min)
H4H11683N	49	81	5,48E+05	1,47E-03	2,69E-09	8
H4H12171P	59	80	5,92E+05	9,63E-04	1,63E-09	12
H4H12161P	41	54	1,18E+05	9,25E-04	7,84E-09	12
H4H12176P2	45	69	2,57E+05	9,58E-04	3,73E-09	12
H4H12163P	60	85	7,24E+05	2,90E-03	4,00E-09	4
H4H12167P	38	65	8,81E+05	2,57E-03	2,91E-09	5
H4H12175P	25	30	1,37E+05	9,50E-03	6,94E-08	1
H4H12159P	51	82	6,38E+05	9,48E-04	1,49E-09	12
H4H 12164P	59	68	1,95E+05	1,06E-03	5,46E-09	11
H4H12168P	34	29	2,43E+04	1,23E-03	5,04E-08	9
H4H12169P	61	79	4,29E+05	7,39E-04	1,72E-09	16
H4H11686N	40	74	4,19E+05	8,00E-04	1,91E-09	14

H4H12170P	36	64	5,59E+05	8,39E-04	1,50E-09	14
H4H12177P2	45	51	2,76E+05	2,76E-03	1,00E-08	4
H4H12183P2	33	36	9,58E+04	7,12E-04	7,43E-09	16
H4H12166P	71	58	6,24E+05	1,31E-03	2,09E-09	9
Comparatore 1	41	5	NB	NB	NB	NB
Comparatore 2	23	47	8,39E+05	1,05E-03	1,25E-09	11

Tabella 10: Parametri cinetici di legame di anticorpi monoclonali anti-C5 che si legano a C5 R885C-mmh umano a 37°C

Anticorpo	Quantità di anticorpo catturato (RU)	C5 R885C-mmh umano 100 nM legato (RU)	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
			(1/Ms)	(1/s)	(M)	(min)
H4H11683N	48	78	4,38E+05	1,43E-03	3,25E-09	8
H4H12171P	59	78	4,77E+05	9,57E-04	2,01E-09	12
H4H12161P	41	49	1,10E+05	9,01E-04	8,17E-09	13
H4H12176P2	44	55	1,41E+05	1,03E-03	7,32E-09	11
H4H12163P	59	83	5,66E+05	2,81E-03	4,97E-09	4
H4H12167P	38	64	6,84E+05	2,49E-03	3,64E-09	5
H4H12175P	25	4	1,12E+05	1,79E-02	1,59E-07	1
H4H12159P	51	68	5,61E+05	9,75E-04	1,74E-09	12
H4H 12164P	59	64	1,77E+05	1,04E-03	5,85E-09	11
H4H12168P	34	21	6,38E+04	5,69E-04	8,90E-09	20
H4H12169P	61	75	3,29E+05	7,37E-04	2,24E-09	16
H4H11686N	39	69	2,84E+05	7,91E-04	2,78E-09	15
H4H12170P	36	61	4,24E+05	8,70E-04	2,05E-09	13
H4H12177P2	43	31	1,07E+05	5,07E-03	4,76E-08	2
H4H12183P2	31	25	5,12E+04	9,97E-04	1,95E-08	12
H4H12166P	72	54	4,91E+05	1,26E-03	2,56E-09	9
Comparatore 1	41	2	NB	NB	NB	NB

Comparatore 2	23	42	7,34E+05	1,07E-03	1,45E-09	11
---------------	----	----	----------	----------	----------	----

A 25°C, tutti i 25 anticorpi anti-C5 dell'invenzione e gli anticorpi anti-C5 divulgati nella presente si legano a C5 umano con valori di K_D che variano da 73 pM a 8,4 nM come mostrato nella Tabella 3. A 37°C, gli anticorpi anti-C5 dell'invenzione e gli anticorpi anti-C5 divulgati nella presente si legano a C5 umano con valori di K_D che variano da 103 pM a 18,5 nM come mostrato nella Tabella 4. A 25°C, 25 dei 25 anticorpi anti-C5 dell'invenzione e gli anticorpi anti-C5 divulgati nella presente sono stati testati legarsi a C5-mmh di scimmia con valori di K_D che variano da 133 pM a 64 nM come mostrato nella Tabella 5. A 37°C, 25 dei 25 anticorpi anti-C5 dell'invenzione e gli anticorpi anti-C5 divulgati nella presente sono stati testati legarsi a C5-mmh di scimmia con valori di K_D che variano da 133pM a 118nM come mostrato nella Tabella 6. A 25 °C, 16 dei 16 anticorpi anti-C5 dell'invenzione e gli anticorpi anti-C5 divulgati nella presente sono stati testati legarsi a C5 R885H-mmh umano con valori di K_D che variano da 147 pM a 10,9 nM come mostrato nella Tabella 7. A 25°C, 16 dei 16 anticorpi anti-C5 dell'invenzione e gli anticorpi anti-C5 divulgati nella presente sono stati testati legarsi a C5 R885C-mmh umano con valori di K_D che

variano da 251 pM a 190 nM come mostrato nella Tabella 8. A 37°C, 16 dei 16 anticorpi anti-C5 dell'invenzione e gli anticorpi anti-C5 divulgati nella presente sono stati testati legarsi a C5 R885H-mmh umano con valori di K_D che variano da 1,49 nM a 69,4 nM come mostrato nella Tabella 9. A 25°C, 16 dei 16 anticorpi anti-C5 dell'invenzione e gli anticorpi anti-C5 divulgati nella presente sono stati testati legarsi a C5 R885C-mmh umano con valori di K_D che variano da 1,74 nM a 159 nM come mostrato nella Tabella 10.

Esempio 4: Legame di anticorpi a C5 attraverso differente pH

L'effetto del pH sulla velocità di dissociazione di C5 umano ricombinante legato agli anticorpi monoclonali anti-C5 purificati è stato determinato usando un biosensore di risonanza plasmonica di superficie in tempo reale usando uno strumento Biacore T200. La superficie del sensore Biacore è stata prima derivatizzata mediante accoppiamento di ammina con un anticorpo monoclonale anti-Fc umano di topo (GE, # BR-1008-39) per catturare gli anticorpi monoclonali anti-C5 espressi con Fc di IgG4 umana. Tutti gli studi di legame con Biacore sono stati eseguiti usando due tamponi di corsa PBS-T, pH 7,4

(0,01 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0,15M NaCl, 0,05% v/v Tween-20, regolato a pH 7,4) e PBS-T, pH 6,0 (0,01M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0,15 M NaCl, 0,05% v/v Tween-20, regolato a pH 6,0). Differenti concentrazioni di C5 umano (EMD, Catalogo # 204888) o C5.mmh di scimmia (preparato in PBS-T, tampone di corsa a pH7,4 (che variano da 100 nM a 11,11nM, diluizioni 3 volte) sono state iniettate sulla superficie dell'anticorpo monoclonale anti-C5 catturato per 3 minuti a una portata di 50µL/minuto e la loro dissociazione in due tamponi di corsa PBS-T, pH7,4 e PBS-T, pH6,0 è stata monitorata per 6 minuti. Tutti gli esperimenti di cinetica di legame sono stati eseguiti a 25°C e 37°C. La costante di dissociazione cinetica (k_d) è stata determinata adattando i sensorigrammi in tempo reale a un modello di legame 1:1 usando il software di adattamento di curve Scrubber 2.0c. Le emivite dissociative di legame ($t_{1/2}$) sono state calcolate da k_d come:

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

I rapporti di emivita per il legame di C5 umano a differenti anticorpi monoclonali anti-C5 a 25°C e 37°C in due tamponi di corsa PBS-T, pH7,4 e PBS-T, pH6,0 sono mostrati nelle Tabelle 11 e 12.

Tabella 11: Rapporti di emivita di anticorpi anti-C5
selezionati per C5 umano a 25°C

mAb catturato	Rapporto $t_{1/2}$
	pH7,4 / pH6,0
H4H12169P	IC
H4H12176P2	IC
H4H12161P	IC
H4H12159P	$\leq 0,3$
H4H12170P	$\leq 0,5$
H4H12166P	4,5
H4H12183P2	IC
H4H12167P	0,6
H4H12164P	0,3
H4H12163P	1,2
H4H12175P	0,9
H4H12177P2	$\leq 0,5$
H4H12171P	0,6
H4H12168P	1,5
H4H12166P2	9,3
H4H12166P3	7,9
H4H12166P4	7,8
H4H12166P5	8,3
H4H12166P6	7,8
H4H12166P7	35
H4H12166P8	47
H4H12166P9	31
H4H12166P1 0	33
H4H11683N	2
H4H11686N	2

IC= non conclusivo

Tabella 12: Rapporti di emivita di anticorpi anti-C5 selezionati su C5 umano a 37°C

mAb catturato	Rapporto $t_{1/2}$
	pH7,4/pH6,0
H4H12169P	IC
H4H12176P2	≤ 0,4
H4H12161P	≤ 0,7
H4H12159P	≤ 0,2
H4H12170P	≤ 0,2
H4H12166P	3,8
H4H12183P2	IC
H4H12167P	0,2
H4H12164P	≤ 0,1
H4H12163P	0,8
H4H12175P	0,9
H4H12177P2	1,3
H4H12171P	3,7
H4H12168P	1
H4H12166P2	7,3
H4H12166P3	6,6
H4H12166P4	7,6
H4H12166P5	7,6
H4H12166P6	8,2
H4H12166P7	21
H4H12166P8	36
H4H12166P9	28
H4H12166P10	19
H4H11683N	1,4
H4H11686N	0,8

IC= non conclusivo

I rapporti di emivita per il legame di C5 di scimmia a differenti anticorpi monoclonali anti-C5 a 25°C e 37°C in due tamponi di corsa PBS-T, pH7,4 e PBS-T, pH6,0 sono mostrati nelle Tabelle 13 e 14.

Tabella 13: Rapporti di emivita di anticorpi anti-C5 selezionati su C5 di scimmia a 25°C

mAb catturato	Rapporto $t_{1/2}$
	pH7,4/pH6,0
H4H12169P	3,4
H4H12176P2	≥ 9,1
H4H12161P	IC
H4H12159P	1,2
H4H12170P	≥ 1,7
H4H12166P	18,5
H4H12183P2	5,8
H4H12167P	9,2
H4H12164P	2,9
H4H12163P	9,7
H4H12175P	3,6
H4H12177P2	3,7
H4H12171P	2,1
H4H12168P	3,8
H4H11683N	0,34
H4H11686N	0,37

IC= non conclusivo

Tabella 14: Rapporti di emivita di anticorpi anti-C5 selezionati su C5 di scimmia a 37°C

mAb catturato	Rapporto $t_{1/2}$
---------------	--------------------

	pH7,4/pH6,0
H4H12169P	2
H4H12176P2	2,8
H4H12161P	10,7
H4H12159P	6,3
H4H12170P	4,7
H4H12166P	7,1
H4H12183P2	2,4
H4H12167P	4,4
H4H12164P	1,1
H4H12163P	3,3
H4H12175P	0,4
H4H12177P2	1,5
H4H12171P	4,7
H4H12168P	4
H4H11683N	0,7
H4H11686N	0,5

IC= non conclusivo

Come mostrato nelle Tabelle 11 - 14, gli anticorpi anti-C5 selezionati hanno mostrato un legame pH-dipendente, come si vede dai rapporti di $t^{1/2}$.

Esempio 5: Competizione incrociata Octet tra anticorpi anti-C5

La competizione di legame tra anticorpi monoclonali anti-C5 (mAb) è stata determinata usando un saggio di interferometria di biostrato privo di etichetta in tempo reale su un biosensore Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.). L'intero esperimento è stato

eseguito a 25°C in HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, tensioattivo Tween-20 0,05% v/v, 0,1 mg/mL di BSA (tampone Octet HBS-P) con la piastra che agita alla velocità di 1000 rpm. Per valutare se 2 anticorpi fossero in grado di competere tra loro per legarsi ai rispettivi epitopi su un C5 umano (hC5 purificato dal plasma, EMD), circa 1,5 nm di mAb anti-C5 umano sono stati prima catturati su punte del biosensore Octet rivestite con anticorpi anti-hFc (Pall ForteBio Corp., # 18-5060) immergendo le punte per 3 minuti in pozzetti contenenti una soluzione 50 µg/mL di mAb anti-C5 umano (successivamente indicato come mAb1). Le punte del biosensore con anticorpo catturato sono state quindi saturate con un mAb di controllo dell'isotipo H4H bloccante (successivamente indicato come mAb bloccante) immergendole in pozzetti contenenti 200 µg/mL di soluzione di mAb bloccante per 4 minuti. Le punte del biosensore sono state quindi successivamente immerse in pozzetti contenenti una soluzione co-complessata di hC5 50 nM e 1 µM di un secondo mAb anti-C5 umano (successivamente indicato come mAb2), che era stato preincubato per 2 ore, per 4 minuti. Le punte del biosensore sono state lavate in tampone Octet HBS-P tra ogni fase dell'esperimento. La risposta di legame in tempo

reale è stata monitorata durante il corso dell'esperimento e la risposta di legame alla fine di ogni fase è stata registrata. La risposta del legame di mAb2 pre-complessato con C5 umano a mAb1 è stata corretta per il legame di fondo, confrontata ed è stato determinato il comportamento competitivo/non-competitivo di differenti anticorpi monoclonali anti-C5.

La Tabella 15 definisce esplicitamente le relazioni tra gli anticorpi che competono in entrambe le direzioni, indipendentemente dall'ordine di legame.

Tabella 15: Competizione incrociata tra coppie di anticorpi anti-C5 selezionati

Primo mAb (mAb1) catturato usando biosensori Octet AHC	anticorpi mAb2 mostrati competere con mAb1
H4H12183P2	H4H12167P; H4H12166P; H4H12163P
H4H12167P	H4H12183P2; H4H12166P; H4H12163P
H4H12166P	H4H12183P2; H4H12167P; H4H12163P
H4H12163P	H4H12183P2; H4H12167P; H4H12166P
H4H12159P	H4H12169P; H4H11683N; H4H12170P
H4H12169P	H4H12159P; H4H11683N; H4H12170P
H4H11683N	H4H12159P; H4H12169P; H4H12170P
H4H12170P	H4H12159P; H4H12169P; H4H11683N
H4H12175P	H4H12177P2
H4H12177P2	H4H12175P
H4H12176P2	H4H12164P
H4H12164P	H4H12176P2

H4H12168P	nessuno
H4H12161P	nessuno
H4H11686N	nessuno

Esempio 6: Inibizione della citotossicità dipendente dal complemento mediata da C5 in un saggio biologico a cellule B

Questo esempio descrive un saggio biologico per testare il ruolo di C5 usando un anticorpo anti-CD20 nella via del complemento classica. È stato dimostrato che gli anticorpi anti-CD20 terapeutici contro l'antigene di superficie delle cellule B CD20, portano alla CDC delle cellule B (Glennie *et al.* 2007, *Mol. Immunol.* 44: 3823-3837) e il saggio CDC che utilizza linee cellulari che esprimono CD20 è stato descritto in precedenza (Flieger *et al.* 2000, *Cell. Immunol.* 204: 55-63). Le cellule Daudi, una linea di cellule B umane che esprime CD20, siero conservato con complemento o siero depleto di C5 con varianti esogene di C5 e un anticorpo anti-CD20 (anticorpo che comprende VH/VL di "2F2" dal brevetto US 8,529,902) sono state usate per valutare il ruolo dell'attività di C5 nella CDC.

Per il saggio biologico C5 CDC, le cellule Daudi sono state seminate su piastre di saggio a 96 pozzetti a 10000 cellule/pozzetto in RPMI contenente o il 10% di FBS, penicillina/streptomina, L-glutamina,

piruvato di sodio e amminoacidi non essenziali (terreni RPMI completi) o RPMI contenente l'1% di BSA, penicillina/streptomina e L-glutammina (RPMI/BSA). Tutti i saggi che testano gli anticorpi anti-hC5 mutati, insieme al test degli anticorpi non mutati con siero umano contenente C5, sono stati testati in terreni RPMI completi, mentre i saggi che testano gli anticorpi non mutati con siero di scimmia verde africana e varianti di C5 umano sono stati testati in terreni RPMI/BSA. Per misurare la CDC con siero umano o di scimmia, l'anticorpo anti-CD20 è stato diluito 1:3 da 100nM a 2pM (incluso un campione di controllo che non contiene anticorpi) e incubato con cellule per 10 minuti a 25°C seguito dall'aggiunta di 1,66% di siero o 1,66% di siero depleto di C5 e 6,6nM di proteine varianti di C5. La quantità di proteina C5 da aggiungere al siero depleto di C5 si è basata sul valore riportato della concentrazione di C5 nel siero umano di 0,37uM (Rawal et al 2008, J. Biol. Chem. 283: 7853-7863). Per testare l'inibizione con anticorpo C5 della CDC, gli anticorpi C5 sono stati diluiti 1:3 da 100nM a 2pM (incluso un campione di controllo che non contiene anticorpi) e incubati con 1,66% di siero o 1,66% di siero depleto di C5 e 6,6 nM di proteine varianti di

C5 per 30 minuti. Dieci minuti prima dell'aggiunta di anticorpi con siero alle cellule, l'anticorpo anti-CD20 è stato aggiunto alle cellule a 1 nM, 2 nM, 3 nM, 3,5 nM, 7 nM, 10 nM o 30 nM. Alla conclusione dell'incubazione con l'anticorpo anti-CD20, la miscela anticorpo/siero è stata aggiunta alle cellule. La citotossicità è stata misurata dopo 3,5 ore di incubazione a 37°C e in 5% di CO₂, seguita da incubazione di 15 minuti a 25°C e aggiunta di reagente CytoTox-Glo™ (Promega, # G9292). CytoTox-Glo™ è un reagente basato su luminescenza che misura l'uccisione cellulare in modo tale che si osservi una maggiore luminescenza con una maggiore citotossicità (misurata in unità di luce relativa, RLU). Cellule non trattate in pozzetti di controllo sono state lisate mediante trattamento con digitonina immediatamente dopo l'aggiunta di reagente CytoTox-Glo™ per determinare l'uccisione massima di cellule. Le piastre sono state lette per la luminescenza mediante uno strumento Victor X (Perkin Elmer) 15 minuti dopo l'aggiunta di CytoTox-Glo™. Dove calcolata, la percentuale di citotossicità è stata calcolata con i valori di RLU usando la seguente equazione:

$$\% \text{Citotossicità} = 100 \times \frac{(\text{Lisi cellulare sperimentale} - \text{lisi cellulare di fondo})}{(\text{Lisi cellulare massima} - \text{lisi cellulare di fondo})}$$

In questa equazione "lisi cellulare di fondo" è la luminescenza dalle cellule trattate con terreni e siero da solo senza alcun anticorpo anti-CD20 e la "lisi cellulare massima" è la luminescenza dalle cellule trattate con digitonina. I risultati, espressi come % di citotossicità o RLU, sono stati analizzati usando la regressione non lineare (logistica a 4 parametri) con il software Prism 5 (GraphPad) per ottenere i valori di EC₅₀ e IC₅₀. L'inibizione di anticorpi è stata calcolata in modo tale che l'inibizione dello 0 - 100% sia l'intervallo di inibizione della concentrazione dell'anticorpo anti-CD20 usato nel saggio senza inibitore per l'anticorpo anti-CD20 0 nM.

Risultati

Un totale di 25 anticorpi anti-C5 umano, 16 non mutati e 9 mutati, sono stati testati per la loro capacità di inibire C5 nel saggio CDC usando cellule Daudi con un anticorpo anti-CD20 e sieri umani (con hC5 normale o varianti di C5) o sieri di scimmia verde africana. Vari residui nelle regioni di determinazione di complementarità (CDR) di H4H12166P sono stati mutati in istidine per generare 9

anticorpi mutati, H4H12166P2-H4H12166P10. È stato dimostrato che le mutazioni di istidina nelle CDR conferiscono dipendenza dal pH del legame con l'antigene bersaglio, portando a una migliore farmacocinetica (Igawa et al. 2010, Nat. Biotechnol.28: 1203-1207).

Tabella 16: Inibizione con anticorpo anti-hC5 non mutato della CDC con 1,66% di siero e anticorpo anti-CD20 in cellule Daudi

Siero	Umano	Umano	Scimmia verde africana	C5 umano depleto e variante di C5 R885H 6,6nM	C5 umano depleto e variante di C5 R885C 6,6nM
EC50 [M] di anticorpo anti-CD20 (con 1,66% di siero)	1,0E-09	1,4E-09	2,4E-09	1,9E-09	2,7E-09
Anticorpo anti-CD20 costante (con 1,66% di siero)	1nM		3nM	3,5nM	30nM
Anticorpo	IC50 [M]		IC50 [M] (Inibizione % massima)*	IC50 [M]	IC50 [M] (Inibizione % massima)*
H4H11683N	Non testato	1,2E-09	4,0E-09	1,3E-09	9,0E-10
H4H11686N	Non testato	1,5E-09	4,4E-09	1,1E-09	4,5E-10
H4H12159P	3,2E-09	Non testato	3,4E-09	1,4E-09	1,0E-09
H4H12161P	2,4E-09	Non testato	2,6E-09	1,8E-09	1,0E-09

H4H12163P	3,4E-09	Non testato	3,7E-09	2,1E-09	1,1E-09
H4H12164P	2,4E-09	Non testato	5,8E-09	1,8E-09	8,2E-10
H4H12166P	2,6E-09	Non testato	4,5E-09	1,3E-09	4,6E-10
H4H12167P	2,5E-09	Non testato	3,5E-09	1,9E-09	1,0E-09
H4H12168P	1,5E-09	Non testato	2,0E-09	2,3E-09	8,6E-10
H4H12169P	1,7E-09	Non testato	2,9E-09	1,3E-09	6,7E-10
H4H12170P	2,0E-09	Non testato	3,7E-09	4,8E-10	4,3E-10
H4H12171P	1,9E-09	Non testato	3,3E-09	1,6E-09	6,5E-10
H4H12175P	2,2E-09	Non testato	5,2E-09	4,2E-09	>2,0E-08 (67%)
H4H12176P2	2,7E-09	Non testato	3,5E-09	2,1E-09	1,3E-09
H4H12177P2	2,2E-09	Non testato	6,1E-09	2,4E-09	1,6E-09
H4H12183P2	1,7E-09	Non testato	1,4E-08	1,2E-09	4,5E-10
Comparatore 1	2,3E-09	1,8E-09	>9,0E-08 (49%)	Nessuna inibizione	Nessuna inibizione
mAb di controllo 1	Nessuna inibizione	Nessuna inibizione	Non testato	Non testato	Non testato
mAb di controllo 2	Non testato	Non testato	Nessuna inibizione	Nessuna inibizione	Nessuna inibizione

*Salvo diversa indicazione, tutte le inibizioni sono ~100%

Come mostrato nelle Tabelle 16 e 17, tutti i 25 anticorpi anti-hC5 hanno mostrato una completa inibizione di CDC mediata da C5 presente nell'1,66% del siero umano. Le IC50 degli anticorpi non mutati variavano da 1,2 a 3,4 nM. Le IC50 degli anticorpi mutati variavano da 3,0 nM a 12 nM. L'anticorpo parentale non mutato H4H12166P ha dato un'inibizione completa con IC50 di 2,6 nM e 2,9 nM.

Tabella 17: Inibizione con anticorpo anti-hC5 mutato di CDC con 1,66% di siero e anticorpo anti-CD20 in cellule Daudi

Siero	Umano	Scimmia verde africana	C5 umano depleto e variante di C5 R885H 6,6 nM	C5 umano depleto e variante di C5 R885C 6,6 nM
EC50 [M] di anticorpo anti-CD20 (con 1,66% di siero)	1,9E-09	2,6E-09	6,3E-09	9,5E-09
Anticorpo anti-CD20 costante (con 1,66% di siero)	2nM	10nM	7nM	30nM
Anticorpo	IC50 [M]	IC50 [M] (Inibizione % massima) *	IC50 [M]	IC50 [M]
H4H12166P	2,9E-09	5,6E-09	1,3E-09	7,6E-10
H4H12166P2	3,7E-09	9,7E-09	1,7E-09	1,2E-09
H4H12166P3	7,8E-09	>3,0E-08 (64%)	2,9E-09	1,7E-09
H4H12166P4	3,5E-09	7,9E-09	1,5E-09	9,6E-10
H4H12166P5	4,9E-09	>3,0E-08 (75%)	2,1E-09	1,4E-09
H4H12166P6	3,0E-09	9,9E-09	1,3E-09	7,9E-10
H4H12166P7	7,3E-09	>6,0E-08 (61%)	4,2E-09	2,3E-09
H4H12166P8	4,1E-09	>2,0E-08 (79%)	2,1E-09	1,2E-09
H4H12166P9	3,9E-09	>1,0E-08 (85%)	1,7E-09	7,7E-10
H4H12166P10	1,2E-08	>1,0E-07 (34%)	7,0E-09	3,5E-09

Comparatore 1	2,7E-09	>1,0E-07 (35%)	Nessuna inibizione	Nessuna inibizione
mAb di controllo 2	Nessuna inibizione	Nessuna inibizione	Nessuna inibizione	Nessuna inibizione

*Salvo diversa indicazione, tutte le inibizioni sono ~100%

I sedici anticorpi anti-hC5 non mutati hanno mostrato una completa inibizione di CDC mediata da C5 di scimmia verde africana con IC50 che variano da 2,0 nM a 14 nM.

Quattro dei 9 anticorpi mutati hanno mostrato una completa inibizione di CDC mediata da C5 di scimmia verde africana con IC50 che variavano da 7,1 nM a 9,9 nM. I restanti sei anticorpi mutati erano bloccanti con IC50 maggiori di 10 nM e un'inibizione massima (a 100 nM di anticorpo) che variava dal 34% all'85%. L'anticorpo parentale non mutato H4H12166P ha dato un'inibizione completa con IC50 di 4,5 nM e 5,6 nM.

Per verificare se gli anticorpi anti-hC5 inibiscono le varianti di C5 umano, R885H e R885C, il siero umano depleto di C5 è stato testato con 6,6 nM di ciascuna variante di C5. Tutti i 25 anticorpi anti-hC5 hanno mostrato una completa inibizione di CDC mediata dalla variante di C5 R885H, con IC50 degli anticorpi non mutati che variavano da 0,48 nM a 4,2 nM, mentre le IC50 degli anticorpi mutati variavano

da 1,3 nM a 7,0 nM. L'anticorpo parentale non mutato H4H12166P ha dato un'inibizione completa con IC50 di 1,3 nM e 1,3 nM.

Quindici su 16 anticorpi anti-hC5 non mutati hanno mostrato una completa inibizione di CDC mediata dalla variante di C5 R885C con IC50 che variavano da 0,43 nM a 1,6 nM. Un anticorpo non mutato ha mostrato una debole inibizione di CDC con un'inibizione massima del 67% (a 100 nM di anticorpo) e una IC50 >20 nM. Tutti i nove anticorpi mutati hanno mostrato una completa inibizione di CDC mediata dalla variante di C5 R885C con IC50 che variavano da 0,77 nM a 3,5 nM. L'anticorpo parentale non mutato H4H12166P ha dato un'inibizione completa con una IC50 di 0,46 nM e 0,76 nM.

L'anticorpo anti-CD20 ha mostrato CDC di cellule Daudi con 1,66% di siero con EC50 di 1,0 nM, 1,4 nM e 1,9 nM per il siero umano, 2,4 nM e 2,6 nM per il siero di scimmia verde africana, 1,9 nM e 6,3 nM per il siero depleto di hC5 con la variante di hC5 R885H e 2,7 nM e 9,5 nM per il siero depleto di hC5 con la variante di hC5 R885C. Nessuno degli anticorpi di controllo IgG irrilevanti, mAb1 di controllo e mAb2 di controllo, ha dimostrato alcuna inibizione di CDC.

Esempio 7: Inibizione dell'attività di C5a come

determinata mediante saggio della luciferasi

Questo esempio descrive un saggio per testare l'attivazione di C5a attraverso uno dei suoi recettori, C5aR1. C5aR1 è un recettore accoppiato a proteine G (GPCR) e può avviare varie vie di segnalazione accoppiate a GPCR (Monk *et al.* 2007, *Br. J. Pharmacol.* 152: 429-448). È stato stabilito un saggio biologico usando cellule HEK293 trasfettate stabilmente con C5aR1 umano (N. di accesso NP_001727.1) e G α 16 umano (N. di accesso NP_002059.3) insieme a un reporter di luciferasi [elemento di risposta NFAT (4X)-luciferasi]. G α 16 è una proteina G relativamente promiscua che può accoppiarsi a diversi tipi di GPCR portando all'attivazione di PLC- β e alla successiva elevazione di Ca⁺⁺, che a sua volta attiva la traslocazione di NFAT e la trascrizione del gene reporter (Kostenis *et al.* 2005, *Trends Pharmacol. Sci.* 26: 595-602). La linea cellulare risultante, HEK293/ hG α 16/hC5aR1/NFAT-luc, è stata isolata e mantenuta in DMEM 10% contenente FBS 10%, NEAA, penicillina/streptomicina, 500 μ g/mL di G418, 100 μ g/ml di igromicina B e 7 μ g/ml di blasticidina.

Per il saggio biologico della luciferasi C5a, le cellule HEK293/hG α 16/hC5aR1/NFAT-luc sono state seminate in piastre di saggio a 96 pozzetti a 20000

cellule/pozzetto in OPTIMEM (Invitrogen, #31985-070) integrate con BSA 0,5%, penicillina/streptomicina e L-glutamina, e poi incubate a 37°C e CO₂ 5% durante la notte. BSA è stata usata al posto di FBS, poiché è stato dimostrato che il siero cliva e inattiva hc5a (Klos *et al.*, 2013, Pharmacol. Rev. 65: 500-543). La mattina successiva, hc5a è stato titolato da 100 nM a 2 pM (incluso un campione di controllo che non contiene hc5a) e aggiunto alle cellule per determinare la curva di titolazione dose-risposta per la linea cellulare. Per testare l'inibizione con anticorpo verso hc5a di hc5a, 500 pM di hc5a sono stati aggiunti alle cellule. Subito dopo, alle cellule sono stati aggiunti anticorpi diluiti 1:3 da 100 nM a 2 pM (incluso un campione di controllo che non contiene anticorpi). Le cellule sono state incubate per 5,5 ore a 37°C in presenza del 5% di CO₂. L'attività della luciferasi è stata rilevata dopo l'incubazione con il reagente OneGlo™ (Promega, #E6051). OneGlo™ è un reagente basato su luminescenza che misura la quantità di luciferasi presente nelle cellule. In questo saggio, una maggiore attivazione di hc5a porta ad una maggiore produzione di luciferasi e luminescenza (misurata in unità di luce relativa, RLU). La misurazione della luminescenza è

stata eseguita usando uno strumento Victor X (Perkin Elmer). I risultati sono stati analizzati usando la regressione non lineare (logistica a 4 parametri) con il software Prism 5 (GraphPad) per ottenere i valori di EC₅₀ e IC₅₀. L'inibizione degli anticorpi è stata calcolata in modo tale che l'inibizione dello 0 - 100% sia l'intervallo di inibizione da 500 pM di hC5a senza inibitore a 0 nM di hC5a.

Quattro anticorpi anti-hC5 sono stati testati per la loro capacità di inibire l'attivazione di hC5a del suo recettore, hC5aR1, misurando l'estensione dell'inibizione dell'attivazione di hC5a 500pM di cellule HEK293/hGα16/hC5aR1/NFAT-luc.

Tabella 18: Inibizione con anticorpo anti-hC5 di hC5a 500 pM in cellule HEK293/Gα16/hC5aR1/ NFAT-luc

EC ₅₀ [M] hC5a	3,9E-10
mAb PID o REGN #	Inibizione di hC5a 500 pM
	IC ₅₀ [M]
H2aM11682N	4,6E-10
H2aM11684N	3,5E-11
H2aM11694N	1,4E-10
H2aM11695N	4,2E-11
mAb di controllo	Nessuna inibizione

Come mostrato nella Tabella 18, quattro anticorpi hanno mostrato una completa inibizione di hC5a 500 pM con IC₅₀ che variavano da 0,035 nM a 0,46 nM. Un

anticorpo di controllo IgG irrilevante, mAb3 di controllo, non ha dimostrato alcuna inibizione di hC5a. hC5a ha attivato le cellule HEK293/G α 16/hC5aR1/NFAT-luc con una EC50 di 0,39nM.

Esempio 8: Saggio biologico di emolisi

Per testare l'attività degli anticorpi sono stati sviluppati il saggio di emolisi per la via classica (CH) e il saggio di emolisi per via alternativa (AH). Il CH è un saggio di screening per l'attivazione della via del complemento classica, che è sensibile alla diminuzione, assenza e/o inattività di qualsiasi componente della via. Il CH verifica la capacità funzionale dei componenti del complemento nel siero della via classica di lisare i globuli rossi di pecora (SRBC) pre-rivestiti con anticorpo anti-globuli rossi di pecora di coniglio (emolisina). Quando SRBC rivestiti di anticorpi sono incubati con il siero di test, viene attivata la via classica del complemento e si ottengono i risultati dell'emolisi. Se un componente del complemento è assente, il livello di CH sarà zero; se uno o più componenti della via classica sono diminuiti, il CH sarà diminuito. (Nilsson *et al* 1984, *J. Immunol. Meth.* 72: 49-59). Questo saggio viene usato per la caratterizzazione e lo screening di anticorpi anti-C5

umano ad alta affinità.

Metodi

(A) Saggio di emolisi del complemento della via classica

Il numero desiderato di globuli rossi di pecora (SRBC) è stato lavato in tampone GVB++ e ri-sospeso a 1×10^9 cellule/mL. Per sensibilizzare gli SRBC, sono stati miscelati con un volume uguale dell'anti-emolisina di pecora di coniglio diluito 1:50 (1,5 mg/ml) a 37°C per 20 minuti. Le cellule SRBC sensibilizzate sono state diluite a 2×10^8 cellule/ml in GVB++ prima dell'uso nel saggio di emolisi. Il siero umano normale o il siero di scimmia cinomolgo è stato diluito al 2% o al 10% in tampone GVB++. Per testare l'inibizione dell'attività dell'emolisi mediata da C5, gli anticorpi di test sono stati pre-incubati per 20 minuti a 4°C, a concentrazioni che variano da 0,6 nM a 800 nM in siero umano normale al 2% -10% o siero di scimmia cinomolgo al 10% o siero di scimmia verde africana. Piastre a 96 pozzetti con fondo rotondo sono state usate per misurare l'attività di emolisi. Un totale di 100 µl di RBC di pecora sensibilizzati (2×10^8 cellule/ml) sono stati piastrati in una piastra a 96 pozzetti seguiti dall'aggiunta di 100 µl di rispettivi campioni di

siero che sono stati pre-incubati con gli anticorpi di test. Le cellule sono state miscelate delicatamente e incubate a 37°C per 60 minuti. Dopo il tempo di incubazione, le cellule sono state fatte ruotare per centrifugazione a 1250xg a 4°C. Un totale di 100 µl del surnatante è stato trasferito in una piastra con fondo piatto 96 fresca e letto a 412 nm su un lettore di micropiastre Spectramax. L'attività emolitica è stata calcolata alla concentrazione nel siero finale dell'1-5% per i trattamenti.

La percentuale di emolisi è stata calcolata come segue:

$$\%Emolisi = 100 \times \left(\frac{\text{Lisi cellulare sperimentale} - \text{lisi cellulare di fondo}}{\text{Lisi cellulare massima} - \text{lisi cellulare di fondo}} \right)$$

In questa equazione "lisi cellulare di fondo" è la OD a 412nm dalle cellule incubate in solo tampone GVB++ che non contiene siero. La "lisi cellulare massima" è la OD a 412nm dalle cellule trattate con acqua. I risultati, espressi come % di emolisi, sono stati analizzati usando la regressione non lineare (logistica a 4 parametri) con il software Prism 5 (GraphPad) per ottenere i valori di IC₅₀. Dati rappresentati come media ± errore standard della media

(B) Saggio del complemento alternativo

Il numero desiderato di globuli rossi di coniglio (RbRBC) è stato lavato in tampone GVB-Mg²⁺/EGTA e ri-sospeso a 2×10^8 cellule/ml. Il siero umano normale o di scimmia cinomolgo è stato diluito al 10% in tampone GVB-Mg²⁺/EGTA. Per testare l'inibizione dell'attività dell'emolisi mediata da C5, gli anticorpi a concentrazioni che variano da 3nM a 800nM sono stati pre-incubati per 20 minuti a 4°C in siero umano normale o siero di scimmia cinomolgo al 5-10%. Piastre a 96 pozzetti con fondo rotondo sono state usate per misurare l'attività di emolisi. Un totale di 100 µl di RbRBC (2×10^8 cellule/ml) sono stati piastrati in una piastra a 96 pozzetti seguiti dall'aggiunta di 100 µl di siero umano normale al 10% o siero di scimmia cinomolgo o siero di scimmia verde africana che è stato pre-incubato con gli anticorpi anti-C5. Le cellule sono state miscelate delicatamente e incubate a 37°C per 60 minuti. Dopo il tempo di incubazione, le cellule sono state fatte ruotare per centrifugazione a 1250xg a 4°C. Un totale di 100 µl del surnatante è stato trasferito in una piastra con fondo piatto 96 fresca e letto a 412 nm su un lettore di micropiastre Spectramax. L'attività emolitica è stata calcolata alla concentrazione nel siero finale del 5% di siero.

La percentuale di emolisi è stata calcolata come segue:

$$\%Emolisi = 100 \left(\frac{\text{Lisi cellulare sperimentale} - \text{lisi cellulare di fondo}}{\text{Lisi cellulare massima} - \text{lisi cellulare di fondo}} \right)$$

In questa equazione "lisi cellulare di fondo" è la OD a 412nm dalle cellule incubate in solo tampone GVB-Mg/EGTA che non contiene siero o senza alcun anticorpo anti-C5. La "lisi cellulare massima" è la OD a 412nm dalle cellule trattate con acqua. Inibizione mediante anticorpi anti-C5, i valori di IC₅₀ sono stati calcolati usando la regressione non lineare (logistica a 4 parametri) con il software Prism 6 (GraphPad).

Risultati

(A) Inibizione dell'emolisi di C5 umano

Un totale di 25 anticorpi anti-C5 umano (hC5), 16 non mutati e 9 mutati, sono stati testati per la loro capacità di inibire C5 dal siero umano normale (NHS) nel saggio CH50 usando sangue rosso di pecora sensibilizzato (SRBC) e saggio AH50 usando globuli rossi di coniglio (RRBC).

Tabella 19: Inibizione con anticorpo anti-hC5 dell'attività di CP e AP nell'1% o nel 5% di siero umano normale (NHS)

PID mAb	CP umana	AP umana	CP umana	AP umana
---------	----------	----------	----------	----------

	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	% Inibizione massima	% Inibizione massima
H4H12183P2	5,88E-09	1,60E-07	99,9%	78,9%
H4H12176P2	4,58E-09	1,65E-08	94,1%	69,9%
H4H12168P	3,33E-09	2,85E-08	97,5%	66,2%
H4H11686N	3,09E-09	1,30E-08	97,4%	76,2%
H4H12167P	3,68E-09	1,55E-08	99,9%	64,8%
H4H12161P	2,56E-09	2,55E-08	93,7%	56,1%
H4H12163P	2,72E-09	2,05E-08	96,1%	66,0%
H4H12166P	2,80E-09	2,60E-08	95,0%	70,9%
H4H11683N	2,54E-09	3,40E-08	98,1%	73,2%
H4H12159P	2,50E-09	1,75E-08	97,9%	73,4%
H4H12177P2	2,34E-09	1,70E-08	97,5%	71,0%
H4H12170P	2,39E-09	1,80E-08	98,2%	81,1%
H4H12175P	2,36E-09	2,00E-08	98,0%	80,2%
H4H12171P	2,33E-09	1,55E-08	94,9%	42,0%
H4H12164P	2,10E-09	1,45E-08	95,9%	69,7%
H4H12169P	2,36E-09	2,00E-08	98,3%	44,5%
Controllo di isotipo	Nessuna attività	Nessuna attività	Nessuna attività	Nessuna attività

Come mostrato nella Tabella 19, sedici anticorpi anti-hC5 di questa invenzione e anticorpi anti-C5 divulgati nella presente hanno mostrato più del 94% di inibizione dell'emolisi nella via classica (CP) mediata da C5 presente nell'1% del siero umano. Le IC₅₀ degli anticorpi variavano da 2,1 a 5,9 nM e la percentuale di inibizione variava dal 95%-99%. Tutti i 16 anticorpi anti-C5 hanno mostrato più del 60% di inibizione (ad eccezione di H4H12169P) nel saggio di

emolisi della via alternativa (AP) mediata da C5 presente nel 5% di NHS. Le IC₅₀ degli anticorpi variavano da 13 a 160 nM e l'attività di inibizione percentuale variava dal 44% all'81%.

Tabella 20: Inibizione con anticorpo anti-hC5 dell'attività di CP e AP nel 5% di siero umano normale (NHS)

PID mAb	CP umana	AP umana	CP umana	AP umana
	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	% Inibizione massima	% Inibizione massima
H4H12166P	1,09E-08	2,09E-08	99,4%	86,9%
H4H12166P2	1,59E-08	4,78E-08	98,2%	81,3%
H4H12166P3	1,34E-08	6,00E-08	95,9%	78,3%
H4H12166P4	1,32E-08	3,17E-08	98,6%	77,0%
H4H12166P5	1,49E-08	6,55E-08	97,1%	77,7%
H4H12166P6	1,03E-08	2,84E-08	98,1%	82,4%
H4H12166P7	2,43E-08	1,56E-07	93,7%	83,2%
H4H12166P8	1,41E-08	7,30E-08	95,7%	73,3%
H4H12166P9	1,16E-08	5,35E-08	93,7%	72,2%
H4H12166P10	4,44E-08	Nessuna attività	74,0%	Nessuna attività
Controllo di isotipo	Nessuna attività	Nessuna attività	Nessuna attività	Nessuna attività

Come mostrato nella Tabella 20, tutti i 9 anticorpi anti-hC5 mutati hanno mostrato inibizione dell'attività di emolisi di CP e AP mediata da C5 presente nel 5% del siero umano. Nel saggio di emolisi di CP, l'anticorpo parentale non mutato

H4H12166P ha mostrato un'inibizione maggiore del 98% con IC50 di 10,9 nM. Otto anticorpi anti-hC5 mutati hanno mostrato più del 90% di inibizione con IC50 che variava da 10,3 nM a 24,3 nM. L'anticorpo anti-C5 mutante 12166P10 ha mostrato un'inibizione parziale del 74%. Nel saggio di emolisi di AP l'anticorpo parentale non mutato H4H12166P ha mostrato un'inibizione maggiore dell'85% con IC50 di 20,9 nM. Gli anticorpi anti-hC5 mutati hanno mostrato un intervallo di inibizione dal 72-83% e le IC50 degli anticorpi variavano da 28 nM a 0,15 µM.

(B) Inibizione dell'emolisi di C5 della scimmia

Un totale di 25 anticorpi anti-C5 umano (hC5), 16 non mutati e 9 mutati, sono stati testati per la loro capacità di inibire C5 dalla scimmia cinomolgo e dalla scimmia verde africana nel saggio CH50 usando sangue rosso di pecora sensibilizzato (SRBC) e saggio AH50 usando globuli rossi di coniglio (RRBC).

Tabella 21: Inibizione con anticorpo anti-hC5 dell'attività di CP e AP nel 5% di sieri normali di scimmia verde africana (AGM)

	CP siero AGM	AP siero AGM	CP AGM	AGMAP
PID mAb	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	% Inibizione massima	% Inibizione massima
H4H12183P2	Nessuna attività	Nessuna attività	Nessuna attività	Nessuna attività

H4H12176P2	3,04E-08	4,77E-08	91,0%	83,2%
H4H12168P	2,80E-08	2,25E-08	90,8%	88,2%
H4H11686N	4,82E-08	1,63E-07	49,3%	50,4%
H4H12167P	6,95E-08	6,95E-08	90,5%	53,4%
H4H12161P	3,19E-08	4,75E-08	78,9%	35,7%
H4H12163P	6,90E-08	2,16E-07	83,2%	58,5%
H4H12166P	1,30E-07	2,33E-07	81,0%	44,2%
H4H11683N	2,92E-08	4,08E-08	81,1%	88,1%
H4H12159P	2,58E-08	2,70E-08	93,4%	93,5%
H4H12177P2	1,80E-07	1,01E-07	80,6%	8,80%
H4H12170P	2,54E-08	2,69E-08	94,9%	90,9%
H4H12175P	1,18E-07	9,85E-08	84,5%	17,4%
H4H12171P	Nessuna attività	2,33E-08	17,8%	69,70%
H4H12164P	2,47E-07	1,78E-07	85,8%	15,60%
H4H12169P	3,44E-08	9,15E-08	43,3%	45,70%

Come mostrato nella Tabella 21, gli anticorpi anti-hC5 hanno mostrato differenti livelli di inibizione dell'attività di emolisi di CP o AP nel 5% di sieri di scimmia verde africana. Nel saggio CP, due dei 16 anticorpi anti-hC5 non hanno mostrato alcuna inibizione dell'attività di emolisi. Quattordici anticorpi hanno mostrato un'inibizione che variava dal 43-94%, con IC50 che variavano da 25 nM a 180 nM. Nel saggio di emolisi di AP, tredici dei 17 anticorpi hanno mostrato un'attività di inibizione che variava dal 17%-93% con IC50 che variavano da 22,5 nM a 233 nM.

Tabella 22: Inibizione con anticorpo anti-hc5 dell'attività di CP e AP nel 5% di sieri normali di scimmia cinomolgo (Cino)

	CP siero di cino	AP siero di cino	CP di Cino	AP di Cino
PID mAb	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	% Inibizione massima	% Inibizione massima
H4H12183P2	1,42E-07	2,96E-08	64,6%	100,0%
H4H12171P	8,70E-09	7,20E-09	92,9%	98,8%
H4H12170P	8,20E-09	7,00E-09	99,0%	99,2%
H4H12159P	7,75E-09	7,05E-09	99,3%	99,6%
H4H12168P	1,03E-08	5,45E-09	99,0%	99,7%
H4H11683N	9,00E-09	7,15E-09	98,8%	98,9%
H4H12176P2	1,47E-08	7,70E-09	97,5%	99,3%
H4H12161P	2,79E-08	7,80E-09	100,0%	98,4%
H4H12169P	1,99E-08	7,95E-09	92,8%	96,30%
H4H11686N	1,41E-08	9,00E-09	94,5%	98,7%
H4H12163P	1,65E-08	1,02E-08	96,4%	98,5%
H4H12167P	2,13E-08	7,60E-09	100,0%	98,30%
H4H12175P	1,09E-08	8,05E-09	96,7%	98,10%
H4H12166P	2,01E-08	8,85E-09	94,2%	98,60%
H4H12177P2	1,71E-08	8,80E-09	94,90%	98,10%
H4H12164P	1,96E-08	9,10E-09	94,7%	98,70%
Controllo di isotipo	Nessuna attività	Nessuna attività	Nessuna attività	Nessuna attività

Come mostrato nella Tabella 22, gli anticorpi anti-hc5 (ad eccezione di H4H12183P2, che ha mostrato il 64% di inibizione di CP) hanno mostrato più del 90% di inibizione del saggio di emolisi di CP o AP nel 5%

del siero di scimmia cinomolgo. Nel saggio di emolisi di CP, le IC50 degli anticorpi variavano da 7,15 nM a 142 nM. Nel saggio di emolisi di AP, le IC50 degli anticorpi variavano da 5,4 a 29,6 nM.

(C) Inibizione dell'emolisi di C5 umano variante

Anticorpi anti-C5 selezionati sono stati testati per la loro capacità di inibire C5 umano variante (si veda l'Esempio 3 nella presente) dal siero umano depleto di C5 nel saggio CH50. Nel siero umano depleto di C5 integrato con la variante esogena di C5 R885H, H4H12166P e Comparatore 2 hanno bloccato l'emolisi di CP con valori di IC50 di 6,0 nM e 4,4 nM, rispettivamente, e valori di IC80 di 7,6 nM e 5,5 nM, rispettivamente. Per la variante R885C, H4H12166P e Comparatore 2 hanno bloccato l'emolisi di CP nel siero umano depleto di C5 con varianti esogene di C5 con una IC50 di 9,3 nM e 6,8 nM, rispettivamente, e valori di IC80 di 11 nM e 8,2 nM, rispettivamente. Come previsto, Comparatore 1 non ha bloccato l'attività emolitica delle varianti di C5 umano.

(D) Inibizione del complesso C5b-6 umano

Anticorpi anti-C5 selezionati sono stati testati per la loro capacità di inibire il complesso C5b-6 umano dal siero umano depleto di C5 nel saggio CH50. H4H12166P ha bloccato potentemente l'emolisi di CP

nel siero umano depleto di C5 integrato con il complesso esogeno di huC5b-6 con una IC50 di 3,8 nM e un valore di IC80 di 5,8 nM. Al contrario, Comparatore 1 ha bloccato l'emolisi mediata dal complesso C5b-6 con potenza inferiore, con valori di IC50 di 5,0 nM e valori di IC80 di 46 nM rispettivamente. Comparatore 1 ha inibito solo il 70% dell'emolisi totale alle massime concentrazioni testate. Comparatore 2 non ha bloccato l'attività emolitica del complesso C5b-6 umano.

Esempio 9: Gli anticorpi anti-C5 bloccano la generazione di C5a nel saggio di emolisi di CP

Per valutare se gli anticorpi anti-C5 inibiscono la generazione di C5a, i surnatanti del saggio per l'emolisi della via classica (CP) sono stati analizzati per i livelli di C5a mediante ELISA.

C5a, generato come risultato del clivaggio di C5, è un frammento di proteina di 74 amminoacidi. C5a viene rapidamente metabolizzato dalle carbossipeptidasi del siero in una forma di 73 amminoacidi più stabile, meno attiva, C5a des-Arg, mediante rimozione dell'arginina C-terminale. La quantificazione di C5a des-Arg fornisce quindi una misurazione affidabile per monitorare la generazione di C5a in vivo e in vitro. Il kit MicroVue C5a ELISA usato qui rileva C5a

des-Arg secondo le informazioni fornite dal produttore. Esperimenti preliminari (dati non mostrati) indicano che viene rilevata anche la forma di 74 amminoacidi primari di C5a. Ai fini del presente Esempio, entrambi le forme saranno indicate collettivamente come "C5a".

I livelli di proteina C5a sono stati determinati in surnatanti dal saggio di emolisi di CP usando siero umano normale conservato nel complemento (NHS) pre-incubato con H4H12166P o anticorpo di controllo di isotipo come descritto nell'Esempio 8. I livelli di proteina C5a sono stati misurati usando il kit MicroVue C5a ELISA secondo le istruzioni del produttore. In breve, i campioni sono stati diluiti e incubati su piastre pre-rivestite con anticorpo di cattura (anti-C5a di topo specifico per un neo-epitopo su C5a umano). La proteina C5a umana fornita dal produttore è stata usata come standard per la calibrazione. C5a nei surnatanti è stato rilevato mediante anticorpo di rilevamento (anticorpo monoclonale di topo contro la regione C5a di C5) coniugato con HRP. Il substrato di HRP cromogenico, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), è stato aggiunto per rilevare l'attività di HRP. È stata usata una soluzione di acido cloridrico 1N per arrestare la

reazione, e la densità ottica a 450 nm (OD450) è stata misurata su un lettore di piastre SpectraMax. I dati sono stati analizzati usando la regressione non lineare (logistica a 4 parametri) in GraphPad Prism. La concentrazione di C5a è stata espressa come ng/ml di surnatante.

Nel saggio che usa il 5% di NHS, H4H12166P ha bloccato potentemente gli aumenti dei livelli di proteina C5a in modo dose-dipendente con una IC50 di 8,5 nM, mentre l'anticorpo di controllo dell'isotipo non ha avuto alcun effetto sui livelli di C5a (FIG. 1). Il blocco massimo alla più alta concentrazione di H4H12166P testata (267 nM) ha determinato una diminuzione di ~10 volte dei livelli di C5a a 3,8 ng/ml (0,3 nM), rispetto a 34 ng/ml (2,8 nM) osservati alla più bassa concentrazione di H4H12166P testata (1 nM) nel siero al 5%. La concentrazione di C5a osservata per il blocco massimo era vicina al livello di C5a al basale di 2,3 ng/ml (0,2 nM) in NHS al 5% non trattato.

Esempio 10: Caratterizzazione della farmacocinetica e della farmacodinamica degli anticorpi anti-C5 nella scimmia cinomolgo

Questo esempio descrive la caratterizzazione della farmacocinetica (PK) e della farmacodinamica (PD) di

anticorpi anti-C5 selezionati condotti in scimmie cinomolgo maschi. I livelli di C5 endogeno sono stati determinati prima del dosaggio di anticorpi anti-C5 e usati per stratificare i gruppi di dose degli animali.

I livelli totali di C5 in circolo nelle scimmie cinomolgo sono stati determinati usando un Human Complement C5 ELISA (Abcam, cat # ab125963), che è stato eseguito secondo le raccomandazioni del produttore. Le concentrazioni medie della proteina C5 nelle scimmie sono state determinate essere $90,85 \mu\text{g/ml} \pm 19,17 \mu\text{g/ml}$.

Per ciascun anticorpo anti-C5, a 4 scimmie cinomolgo è stata somministrata una singola iniezione intravenosa (IV) a una dose di 15 mg/kg. I campioni di sangue sono stati raccolti da ciascun animale dalla pre-dose fino a 1680 ore (70 giorni), trasformati in siero e congelati a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ fino all'analisi per PK e PD.

Analisi del livello di anticorpi IgG totali mediante saggio immunologico ELISA

Le concentrazioni di anticorpi totali nei campioni di siero di scimmia sono state misurate usando un ELISA diretto non-validato. La procedura ELISA ha impiegato una piastra per microtitolazione rivestita con un

anticorpo monoclonale di topo anti-Fc di IgG1/IgG4 umana. Diversi anticorpi anti-C5 sono stati aggiunti alla piastra e gli anticorpi anti-C5 catturati sulla piastra sono stati rilevati usando un anticorpo monoclonale di topo biotinilato anti Fc di IgG4 umana, seguito da NeutrAvidina coniugata con perossidasi di rafano (NeutrAvidina HRP). È stato poi aggiunto un substrato a base di luminolo specifico per la perossidasi per ottenere un'intensità di segnale che è proporzionale alla concentrazione di anticorpo anti-C5 totale catturato. Le misurazioni dell'unità di luce relativa (RLU) degli standard di calibrazione e le loro rispettive concentrazioni nominali sono state adattate usando un'equazione logistica a 4 parametri ponderati per generare un'equazione di calibrazione che descriveva la concentrazione di anticorpi anti-C5 e la relazione di risposta del saggio. Il limite inferiore di quantificazione (LLOQ) era 1,56 ng/ml nel saggio (2% di siero di scimmia) e 78 ng/ml in siero di scimmia puro.

Determinazione dei parametri di PK

I parametri di PK sono stati determinati mediante analisi non compartimentale (NCA) usando il software Phoenix®WinNonlin® (Versione 6.4, Certara, L.P.) e un

modello di dosaggio in bolo IV.

Tutti i parametri di PK sono stati derivati dai rispettivi valori di concentrazione media, inclusa la concentrazione massima osservata nel siero (C_{max}), il tempo di concentrazione di picco osservata, t_{max} e l'emivita stimata osservata ($T_{1/2}$). Per ciascun anticorpo, l'area sotto la curva di concentrazione rispetto al tempo fino all'ultima concentrazione misurabile (AUC_{last}) ed estrapolata dal tempo zero all'infinito (AUC_{inf}) sono state determinate usando una regola trapezoidale lineare con interpolazione lineare e ponderazione uniforme.

Analisi di PD mediante saggio di emolisi ex vivo

La farmacodinamica di anticorpi anti-C5 selezionati è stata analizzata usando i saggi di emolisi della via classica e della via alternativa ex vivo.

Saggio di emolisi della via classica: I globuli rossi di pecora (SRBC) sono stati lavati in tampone GVB++ (tampone Venoral di gelatina con $CaCl_2$ e $MgCl_2$) (Boston BioProducts) e ri-sospesi a 1×10^9 cellule/ml. Per sensibilizzare gli SRBC, un totale di 1×10^9 /mL di SRBC sono stati miscelati con un volume uguale dell'anti-emolisina di pecora di coniglio diluito 1:50 (1,5 mg/ml) a $37^\circ C$ per 20 minuti. Gli SRBC sensibilizzati sono stati diluiti a 2×10^8

cellule/ml in tampone GVB++ prima dell'uso nel saggio di emolisi. Il sangue delle scimmie cinomolgo è stato raccolto prima della somministrazione e a 5 minuti, 4 e 8 ore e 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 18, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 giorni dopo la dose per l'analisi della PD. Il siero è stato preparato e congelato fino a un ulteriore uso. Il giorno del saggio, il siero di cinomolgo dai rispettivi punti temporali è stato diluito al 10% in tampone GVB++. Piastre a 96 pozzetti con fondo rotondo sono state usate per misurare l'attività di emolisi. Un totale di 100 μ l di SRBC sensibilizzati (2×10^8 cellule/ml) sono stati piastrati in una piastra a 96 pozzetti a 37 °C seguiti dall'aggiunta di 100 μ l di siero di scimmia cinomolgo al 10% dai rispettivi punti temporali. Gli SRBC sono stati miscelati delicatamente e incubati a 37 °C per 10 minuti. Dopo il tempo di incubazione, le cellule sono state centrifugate a 1250xg a 4°C. Un totale di 100 μ l del surnatante è stato trasferito in una piastra con fondo piatto 96 fresca e letto a 412 nm su un lettore di micropiastre Spectramax. L'attività emolitica è stata calcolata alla concentrazione nel siero finale del 5%. L'emolisi percentuale è stata calcolata con i valori di assorbanza usando la seguente equazione:

$$\%Emolisi = 100 \leftarrow \frac{(\text{Lisi cellulare sperimentale} - \text{lisi cellulare di fondo})}{(\text{Lisi cellulare massima} - \text{lisi cellulare di fondo})}$$

In questa equazione "lisi cellulare di fondo" è la OD a 412nm dagli SRBC incubati in solo tampone GVB++ che non contiene siero. La "lisi cellulare massima" è la OD a 412nm da SRBC trattati con acqua. I risultati, espressi come % di emolisi, sono stati analizzati usando la regressione non lineare (logistica a 4 parametri) con il software Prism 5 (GraphPad) per ottenere i valori di IC₅₀. I dati sono rappresentati come media ± errore standard della media.

Saggio di emolisi della via alternativa: Il numero desiderato di globuli rossi di coniglio (RbRBC) è stato lavato in tampone GVB-Mg²⁺/EGTA e ri-sospeso a 2×10⁸ cellule/ml. Il sangue delle scimmie cinomolgo è stato raccolto prima della somministrazione e a 5 minuti, 4 e 8 ore e 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 18, 21, 28, 35, 42 e 49 giorni dopo la dose per l'analisi della PD. Il siero è stato preparato e congelato fino a un ulteriore uso. Piastre a 96 pozzetti con fondo rotondo sono state usate per misurare l'attività di emolisi. Un totale di 100µl di RbRBC (2×10⁸ cellule/ml) sono stati piastrati in una piastra a 96 pozzetti a 37°C seguiti dall'aggiunta di 100 µl di

siero di scimmia cinomolgo al 10% dai rispettivi punti temporali elencati sopra. Gli RbRBC sono stati miscelati delicatamente e incubati a 37°C per 60 minuti. Dopo il tempo di incubazione, le cellule sono state centrifugate a 1250xg a 4°C. Un totale di 100 µl del surnatante è stato trasferito in una piastra con fondo piatto 96 fresca che è stata letta a 412 nm su un lettore di micropiastre Spectramax. L'attività emolitica è stata calcolata per la concentrazione nel siero finale del 5% ed espressa come percentuale dell'emolisi totale degli RBC mediante acqua. La percentuale di emolisi è stata calcolata come descritto sopra.

Risultati

Anticorpi anti-C5 selezionati (elencati nella Tabella 1) sono stati testati in esperimenti iniziali per profili farmacocinetici prolungati in scimmie cinomolgo e topi umanizzati con C5 (descritti nell'esempio 10). H4H12166P e H4H12161P sono stati selezionati come aventi un'elevata affinità accoppiata con una PK prolungata e usati in esperimenti successivi nella presente con Comparatore 1 e Comparatore 2.

Alle scimmie cinomolgo è stata somministrata una singola dose in bolo IV di 15 mg/kg di H4H12166P,

H4H12161P o Comparatore 2. Le concentrazioni nel siero di anticorpo totale e l'attività di emolisi percentuale della via classica (CP) sono state determinate a 19 punti temporali durante un periodo di vita di 70 giorni. L'emolisi della via alternativa (AP) è stata determinata a 17 punti temporali durante un periodo di vita di 50 giorni. La Tabella 23 riassume le concentrazioni medie di anticorpi per tutti i 3 anticorpi. Le concentrazioni medie di anticorpi totali rispetto ai profili temporali sono mostrate nella FIG. 2. I parametri di PK medi sono descritti nella Tabella 24.

Tabella 23: Concentrazioni medie di IgG totali nel siero in seguito di una singola iniezione intravenosa di 15 mg/kg di anticorpi anti-C5 selezionati in scimmie cinomolgo maschi

Tempo (ore dopo la dose)	#	Concentrazione nel siero di Ab ($\mu\text{g/ml}$) Media \pm SD		
		H4H12166P	H4H12161P	Comparatore 2
0	4	BLQ	BLQ	BLQ
0,083	4	445 \pm 30	456 \pm 26,2	459 \pm 55,2
4	4	328 \pm 27	360 \pm 28,2	363 \pm 43,8
8	4	353 \pm 29,9	316 \pm 21,5	357 \pm 16,1
24	4	282 \pm 43,6	276 \pm 32,4	248 \pm 19,6
48	4	225 \pm 15,2	221 \pm 21,5	212 \pm 19,3
72	4	180 \pm 15,0	181 \pm 17,2	196 \pm 36,2
120	4	194 \pm 20,9	162 \pm 10,7	179 \pm 23,3

168	4	171 ±29,9	132 ±17,0	157 ±18,4
240	4	157 ±12,7	96,1 ±17,3	114 ±13,0
336	4	120 ±10,2	49,3 ±18,7	67,9 ±25,8
432	4	105 ±13,9	24,6 ±11,8	42,6 ±15,9
504	4	92,2 ±10,6	13,8 ±9,95	28,6 ±13,1
672	4	75,1 ±15,8	6,16 ±2,40	10,9 ±6,25
840	3	59,6 ±4,79	2,44 ±0,85	4,45 ±2,63
1008	3	43,3 ±2,89	1,16 ±0,52	2,17 ±1,58
1176	3	30,6 ±1,42	0,57 ±0,25	1,29 ±1,16
1344	3	25,9 ±3,74	0,315 ±0,16	0,492 ±0,49
1512	3	18,2 ±2,41	0,17 ±0,08	0,270 ±0,27
1680	3	11,5 ±1,51	0,079±0,07	0,123 ±0,15

Tempo = Tempo in ore dopo l'iniezione monodose;

SD = Deviazione standard; BLQ = Sotto il limite di
quantificazione

Dopo la somministrazione del bolo IV, i profili di concentrazione-tempo di IgG totali di H4H12166P, H4H12161P e Comparatore 2 sono stati caratterizzati da una fase di distribuzione iniziale breve seguita da singole fasi di eliminazione per tutto il periodo di vita. Le concentrazioni di picco di H4H12166P, H4H12161P e Comparatore 2 erano altamente comparabili, poiché i corrispondenti valori di $C_{max}/Dose$ tra tutti gli anticorpi erano entro 1,1 volte (29,7, 30,4 e 30,6 $[(\mu g/mL)/(mg/kg)]$, rispettivamente) (Tabella 24).

Tabella 24: Parametri farmacocinetici medi delle

concentrazioni di IgG totali nel siero in seguito di una singola iniezione intravenosa di 15 mg/kg di anticorpi anti-C5 selezionati in scimmie cinomolgo maschio

Parametro	H4H12166P		H4H12161P		Comparatore 2	
	15 mg/kg IV (n = 4)					
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	445	30,0	456	26,2	459	55,2
C_{max}/Dose ($\mu\text{g/mL} / (\text{mg/kg})$)	29,7	2,00	30,4	1,75	30,6	3,68
C_0 ($\mu\text{g/mL}$)	448	30,5	458	26,6	461	55,6
t_{max} (ore)	0,083	0	0,083	0	0,083	0
$AUC_{last\text{giorno}\bullet}$ ($\mu\text{g/ml}$)	5080	1040	2350	357	2810	470
$AUC_{last}/\text{Dose giorno}\bullet$ ($\mu\text{g/ml} / (\text{mg/kg})$)	339	69,3	157	23,8	187	31,3
$AUC_{inf\text{giorno}\bullet}$ ($\mu\text{g/ml}$)	5550	671	2350	356	2810	470
$AUC_{inf}/\text{Dose giorno}\bullet$ ($\mu\text{g/ml} / (\text{mg/kg})$)	370	44,7	157	23,7	188	31,4
CL (ml/h/kg)	0,114	0,0143	0,270	0,0411	0,228	0,0425
V_{ss} (ml/kg)	60,4	4,85	44,0	4,34	45,3	3,06
$t_{1/2}$ (giorno)	15,6	1,43	5,50	2,45	5,91	1,13

IV = intravenoso; n = Numero di animali; C_{max} = Concentrazione di picco; C_0 = Concentrazione iniziale determinata mediante estrapolazione; t_{max} = Tempo a C_{max} ; AUC = Area sotto la curva concentrazione-tempo; AUC_{last} = AUC calcolata dal tempo zero al tempo dell'ultima concentrazione positiva; AUC_{inf} = AUC dal tempo zero estrapolata all'infinito; CL = Clearance corporea totale; V_{ss} = Volume di distribuzione allo

stato stazionario; $t_{1/2}$ = Emivita; SD = Deviazione Standard.

Nota: t_{max} è espresso in ore nominali

La valutazione dei profili concentrazione-tempo ha rivelato che H4H12166P ha dimostrato l'eliminazione più lenta con concentrazioni di anticorpi terminali $\geq 10 \mu\text{g/ml}$ fino al giorno di studio 71. Le cinetiche di H4H12161P e di Comparatore 2 erano simili; entrambi hanno dimostrato un'eliminazione più rapida di H4H12166P, con concentrazioni di mAb $\geq 10 \mu\text{g/ml}$ al giorno 22 e 29, rispettivamente.

Di conseguenza, le esposizioni normalizzate per dose ($AUC_{last}/Dose$) hanno indicato che H4H12166P aveva la più alta esposizione a 339 giorni*($\mu\text{g/ml}$)/(mg/kg), mentre H4H12161P e Comparatore 2 avevano un'esposizione circa 2 volte inferiore, 157 e 187 giorni*($\mu\text{g/ml}$)/(mg/kg), rispettivamente, rispetto a quella di H4H12166P.

L'emivita dell'anticorpo ($t_{1/2}$) calcolata durante la fase di eliminazione variava da 5,5 a 15,6 giorni tra i gruppi di dose e si correlava anche all'esposizione, poiché H4H12166P aveva il corrispondente $t_{1/2}$ più alto di 15,6 giorni, mentre H4H12161P e Comparatore 2 avevano valori $t_{1/2}$ di 5,5 e 5,9 giorni, rispettivamente.

Gli effetti farmacologici degli anticorpi anti-C5 dai campioni di siero di scimmia cinomolgo sono stati determinati ex vivo mediante emolisi della via classica del complemento (CP) di globuli rossi di pecora sensibilizzati (SRBC) ed emolisi della via alternativa (AP) di globuli rossi di coniglio (RbRBC). L'inibizione dell'attività emolitica è stata calcolata per una concentrazione nel siero finale del 5% ed espressa come percentuale dell'emolisi totale degli RBC mediante acqua. La Tabella 25 riassume l'attività ex vivo dei 3 anticorpi come determinato dalla percentuale media di emolisi.

Tabella 25: Attività di emolisi percentuale della via classica e alternativa ex vivo di anticorpi anti-C5 selezionati

Tempo (ore dopo la dose)	#	% di emolisi della via classica nel siero di cinomolgo, 10 min, media \pm SEM			% di emolisi della via alternativa nel siero di cinomolgo, 60 min, media \pm SEM		
		H4H12166P	H4H12161 P	Comparatore 2	H4H12166P	H4H12161P	Comparatore 2
0	4	91,34 \pm 7,6	Non testato	84,36 \pm 20,28	73,44 \pm 17,26	64,90 \pm 19,51	55,77 \pm 10,82
0,083	4	3,5 \pm 1,4	Non testato	6,6 \pm 6,5	5,53 \pm 1,98	5,90 \pm 3,92	3,83 \pm 3,93
4	4	2,35 \pm 1,06	Non testato	3,16 \pm 2,2	7,43 \pm 2,54	6,53 \pm 2,7	5,30 \pm 2,80
8	4	1,55 \pm 0,21	Non testato	1,25 \pm 0,21	3,53 \pm 0,91	4,70 \pm 2,77	1,98 \pm 0,83

24	4	7,7 ±6,08	Non testato	4,55 ±2,05	13,40 ±2,77	4,68 ±1,89	4,65 ±2,35
48	4	2,85 ±2,19	Non testato	2,6 ±0,7	5,53 ±2,40	7,68 ±5,22	2,28 ±0,67
72	4	0,9 ±0,42	Non testato	1,3 ±0,28	7,95 ±3,36	5,95 ±2,23	1,45 ±0,33
120	4	1,75 ±0,07	Non testato	1,3 ±0,14	16,38 ±6,91	7,60 ±1,94	1,68 ±0,22
168	4	1,6 ±1,13	Non testato	1,4 ±0,56	21,28 ±8,24	10,75 ±2,27	2,15 ±0,19
240	4	1 ±0,14	Non testato	3,7 ±2,83	19,18 ±10,20	13,53 ±7,17	14,20 ±16,73
336	4	2,55 ±2,05	Non testato	37,85 ±5,3	21,10 ±7,55	50,58 ±12,91	65,60 ±26,04
432	4	1,35 ±0,91	Non testato	105,25 ±3,3	15,20 ±10,86	59,75 ±12,65	54,55 ±19,11
504	4	3,55 ±2,05	Non testato	107,1 ±4,38	33,15 ±8,80	88,55 ±24,63	85,63 ±27,48
672	4	2,2 ±0,56	Non testato	88,9 ±23,05	75,25 ±18,30	88,55 ±8,53	91,58 ±18,55
840	3	3,075 ±2,70	Non testato	105,37 ±53,4	46,65 ±5,30	92,33 ±5,16	91,85 ±2,33
1008	3	15,5 ±26,6	Non testato	108,85 ±2,35	58,60 ±9,48	92,45 ±6,27	92,30 ±2,69
1176	3	58,33 ±39,55	Non testato	113,85 ±2,62	72,95 ±5,87	104,90 ±3,5	101,90 ±0,42
1344	3	71,55 ±43,02	Non testato	110,3±1,98	Non testato	Non testato	Non testato
1512	3	91,375 ±29,7	Non testato	110,6±0,85	Non testato	Non testato	Non testato
1680	3	112,22 ±4,06	Non testato	112,15±0,5	Non testato	Non testato	Non testato

Tempo = Tempo in ore dopo l'iniezione monodose; SEM =

Errore standard della media; BLQ = Sotto il limite di quantificazione; NC = Non calcolato

Come mostrato nella Tabella 25 e nella FIG. 2, gli effetti di PD sono stati misurati mediante CP di complemento (incubazione di 10 minuti) al Giorno 70. H4H12166P ha bloccato oltre il 95% dell'attività emolitica di CP fino al giorno 35. L'attività è tornata ai livelli massimi di emolisi pre-studio entro il giorno 70. Comparatore 2 ha bloccato circa il 95% dell'attività emolitica CP fino al giorno 10 e l'attività è tornata rapidamente ai livelli massimi di emolisi pre-studio entro il giorno 18.

Gli effetti di PD sono stati misurati anche mediante saggi di emolisi della via del complemento AP (incubazione di 60 minuti) al giorno 49. Come mostrato nella Tabella 25 e nella FIG. 3, H4H12166P ha bloccato l'80% dell'attività emolitica totale di AP fino al giorno 18 e l'attività è tornata al livello massimo di emolisi pre-studio al giorno 50. H4H1216P e Comparatore 2 hanno bloccato il 90% dell'attività emolitica AP fino al giorno 7 e l'attività è tornata ai livelli massimi di emolisi pre-studio entro il giorno 21.

Esempio 11: Caratterizzazione di PK/PD di anticorpi anti-C5 in topi C5-umanizzati

In questa serie di esperimenti, la farmacocinetica e la farmacodinamica di anticorpi anti-C5 selezionati sono state valutate in topi umanizzati per esprimere la proteina C5 umana usando la tecnologia Velocigene® (Valenzuela et al 2003, Nat. Biotechnol. 21: 652-659). Topi umanizzati sono stati ingegnerizzati per sostituire l'esone 2 attraverso l'esone 41 del gene C5 murino con esoni 2-42 del gene C5 umano (divulgato nella pubblicazione di domanda di brevetto US 2015/0313194).

I livelli totali di C5 umano in circolo sono stati determinati usando un Human Complement C5 ELISA (Abcam, cat # ab125963), che è stato eseguito secondo le raccomandazioni del produttore.

Determinazione del livello totale di farmaco nel siero mediante ELISA

Le concentrazioni di anticorpi anti-C5 in circolo, sia C5-legati che -non legati, sono state determinate mediante analisi di anticorpi umani totali usando ELISA. In breve, un anticorpo policlonale anti-IgG umana di capra a 1 µg/ml in PBS è stato immobilizzato su piastre da 96 pozzetti durante la notte; le piastre sono state lavate per rimuovere l'IgG non legata e poi bloccate con il 5% di BSA. Diluizioni seriali di anticorpi anti-C5 contenenti campioni di

siero (6 punti) e gli standard di riferimento (12 punti) dei rispettivi anticorpi sono stati trasferiti alle piastre rivestite con anti-IgG umana e incubati per un'ora. Gli anticorpi anti-C5 legati alla piastra sono stati poi rilevati usando un anticorpo policlonale anti-IgG umana di capra coniugato con perossidasi di rafano. Le piastre sono state sviluppate con substrato di TMB secondo il protocollo raccomandato dal produttore e i segnali di densità ottica (OD) a 450 nm sono stati registrati usando un Perkin Elmer Victor X4 Multimode Plate Reader. Le concentrazioni di anticorpi anti-C5 nel siero sono state calcolate in base alla curva di calibrazione standard di riferimento generata usando il software GraphPad Prism.

Determinazione dei parametri di PK

I parametri di PK sono stati determinati mediante analisi non compartimentale (NCA) usando il software Phoenix®WinNonlin® (Versione 6.3, Certara, L.P.) e un modello di dosaggio extravascolare. Usando i rispettivi valori di concentrazione media per ciascun anticorpo, tutti i parametri di PK, inclusa l'emivita stimata osservata ($t_{1/2}$) e l'area sotto la curva di concentrazione rispetto al tempo fino all'ultima concentrazione misurabile (AUC_{last}) sono stati

determinati usando una regola trapezoidale lineare con interpolazione lineare e ponderazione uniforme.

Analisi di PD mediante saggio di emolisi

La farmacodinamica di anticorpi anti-C5 selezionati è stata determinata usando un saggio di emolisi del complemento della via classica. I globuli rossi di pecora (SRBC) (sangue di pecora in soluzione di Alsevers) sono stati lavati in tampone GVB++ (tampone Venoral di gelatina con CaCl₂ e MgCl₂) (Boston BioProducts) e ri-sospesi a 1×10^9 cellule/ml. Per sensibilizzare, 1×10^9 /ml di SRBC sono stati miscelati con un volume uguale dell'anti-emolisina di pecora di coniglio diluito 1:50 (1,5 mg/ml) a 37°C per 20 minuti. Gli SRBC sensibilizzati sono stati diluiti a 2×10^8 cellule/ml in GVB++ prima dell'uso nel saggio di emolisi. I campioni di siero di animali pre-dosati o di topi C5 umanizzati a cui sono stati somministrati anticorpi anti-C5 raccolti nei giorni 10, 20, 30, 40 e 50 dopo la dose sono stati diluiti al 20% in tampone GVB++. Un totale di 100 µl di SRBC sensibilizzati (2×10^8 cellule/ml) sono stati piastrati in piastre a fondo tondo a 96 pozzetti a 37°C seguiti dall'aggiunta di 100 µl di siero al 20% che è stato integrato con 160-180 µg/ml di proteina del complemento umano 3 (huC3). Le cellule sono state

miscelate delicatamente e incubate a 37 °C per 1 ora. Dopo l'incubazione, le cellule sono state centrifugate a 1250xg a 4°C. Un totale di 100 µl di surnatante è stato trasferito in una piastra con fondo piatto 96 fresca e letto a A412nm su un lettore di micropiastre Spectramax. L'emolisi percentuale è stata calcolata con i valori di assorbanza usando la seguente equazione:

$$\%Emolisi = 100 \times \left(\frac{\text{Lisi cellulare sperimentale} - \text{lisi cellulare di fondo}}{\text{Lisi cellulare massima} - \text{lisi cellulare di fondo}} \right)$$

In questa equazione "lisi cellulare di fondo" è la OD a A412nm da SRBC incubati in solo tampone GVB++ che non contiene siero. La "lisi cellulare massima" è la OD a A412nm da SRBC trattati con acqua. I risultati, espressi come % di emolisi, sono stati analizzati usando la regressione non lineare (logistica a 4 parametri) con il software Prism 6 (GraphPad) per ottenere i valori di IC₅₀. Dati rappresentati come media ± (errore standard della media).

Esperimento 1

In questo esperimento, la farmacocinetica e la farmacodinamica dell'anticorpo esemplificativo H4H12166P sono state valutate in confronto con Comparatore 1 e Comparatore 2 in topi C5 umanizzati. I livelli totali di C5 umano in circolo sono stati

determinati usando un Human Complement C5 ELISA (Abcam, cat # ab125963), che è stato eseguito secondo le raccomandazioni del produttore. Le concentrazioni medie di C5 umano nei topi sono state determinate essere $39,73 \mu\text{g/mL} \pm 17,82 \mu\text{g/mL}$. C'era una differenza tra topi maschi ($55,4 \pm 1,7 \mu\text{g/ml}$, $n=47$) e femmine ($24,7 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$, $n=49$).

Prima del dosaggio dell'anticorpo, topi C5 umanizzati maschi e femmine sono stati stratificati secondo livelli di C5 umani che erano in media di $40 \mu\text{g/ml}$. Per ciascun anticorpo anti-C5, coorti di ventidue topi hanno ricevuto una singola dose di 15 mg/kg di H4H12166P, Comparatore 1 o Comparatore 2 mediante iniezione sottocutanea (s.c.). Tutti i topi sono stati sottoposti a sanguinamento pre-dose e un giorno dopo l'iniezione per l'analisi di PK. Inoltre, a 10, 20, 30, 40 e 50 giorni dopo l'iniezione, gruppi di 4 o 5 topi di ciascuna coorte sono stati sottoposti a eutanasia e sono stati raccolti sanguinamenti terminali per l'analisi di PK e PD. I campioni di siero del giorno 1 erano la media dell'intera coorte di 22 topi. Il sangue è stato trasformato in siero e congelato a -80°C fino all'analisi.

Le concentrazioni di anticorpi totali sono state determinate a 7 punti temporali e l'attività di

emolisi percentuale è stata determinata a 6 punti temporali nel periodo di vita di 50 giorni. Le concentrazioni totali di anticorpi anti-C5 sono riassunte nella Tabella 26. Le concentrazioni medie di anticorpi totali rispetto al profilo temporale sono mostrate nella FIG. 4. I parametri di PK medi sono descritti nella Tabella 27.

Tabella 26: Concentrazioni medie di IgG totali nel siero in seguito di una singola iniezione sottocutanea di 15 mg/kg di anticorpi anti-C5 in topi C5 umanizzati

Tempo (giorno)	#	Concentrazione nel siero di Ab ($\mu\text{g/ml}$) Media \pm SD		
		H4H12166P	Comparatore 1	Comparatore 2
1	22	178 \pm 22,7	229 \pm 40,7	164 \pm 24,1
10	4	83,7 \pm 22,2	102 \pm 22,9	44 \pm 24,1
20	5	57,1 \pm 26,8	29 \pm 31,3	11,4 \pm 10,3
30	5	38,1 \pm 7,6	30,1 \pm 34,2	3,6 \pm 3,2
40	4	11,9 \pm 5,0	0,4 \pm 0,4	0,5 \pm 0,4
50	4*	9,3 \pm 12,2	0,3 \pm 0,3	0,3 \pm 0,2

Tempo = Tempo in ore dopo l'iniezione monodose;

Giorno = Giorno di studio; SD = Deviazione standard;

SEM = Errore standard della media; ND = Non rilevato;

NS = Nessun campione. *Per Comparatore 2, giorno 50,

n= tre a causa dell'incapacità di un campione di

essere analizzato a causa di problemi tecnici.

Tabella 27: Parametri PK

Parametro	Unità	H4H1216 6P	Comparatore 1	Comparatore 2
Concentrazione di mAb al giorno 1	µg/ml	178	229	164
AUC _{last}	giorno · µg/ ml	2801	2708	1418
t _{1/2}	d	11,3	4,7	7,6

C_{max}= Concentrazione di picco; AUC = Area sotto la curva concentrazione-tempo; AUC_{last} = AUC calcolata dal tempo zero al tempo dell'ultima concentrazione positiva; T_{1/2} = Emivita stimata osservata

I profili di concentrazione media rispetto al tempo al giorno 1 mostrano che i tre anticorpi, H4H12166P, Comparatore 1 e Comparatore 2 avevano concentrazioni nel siero comparabili di 178, 229 e 164 µg/ml, rispettivamente. Comparatore 1 aveva un profilo di eliminazione simile a H4H12166P fino al giorno 30, ma ai giorni 40 e 50 ha mostrato un rapido aumento della clearance rispetto a H4H12166P. Al giorno 50, H4H12166P aveva una concentrazione nel siero media di anticorpi di approssimativamente 9 µg/ml, mentre Comparatore 1 e Comparatore 2 avevano entrambi una concentrazione nel siero media di anticorpi 30 volte inferiore di 0,3 µg/ml. Comparatore 2 ha mostrato l'esposizione più bassa dei tre anticorpi testati, con un'AUC circa 2 volte inferiore ad AUC_{last} (1408 giorno · µg/ml) rispetto a H4H12166P (2801

giorno $\cdot \mu\text{g/ml}$) e Comparatore 1 (2708 giorno $\cdot \mu\text{g/ml}$).

Gli effetti farmacologici degli anticorpi anti-C5 H4H12166P, Comparatore 1 e Comparatore 2 da campioni di siero di topo C5 umanizzato integrati con C3 umano sono stati misurati fino al giorno 50 e sono stati determinati ex vivo mediante emolisi della via classica del complemento (CP) di SRBC sensibilizzati. L'emolisi percentuale media per ciascun anticorpo anti-C5 è riassunta nella Tabella 28 e l'emolisi percentuale media rispetto al profilo temporale è mostrata nella FIG. 5.

Tabella 28: Attività di emolisi percentuale della via classica ex vivo di anticorpi anti-C5 umano

Tempo (giorno)	#	% di emolisi della via classica nel siero di topo al 10%, 60 min, media \pm SEM		
		H4H12166P	Comparatore 1	Comparatore 2
1	22	NS	NS	NS
10	4	12,6 \pm 7,79	10,39 \pm 2,88	12,06 \pm 9,12
20	5	18,8 \pm 8,1	21,59 \pm 17,53	65,08 \pm 52,87
30	5	13,76 \pm 10,9	78,98 \pm 40,3	91,67 \pm 16,74
40	4	41,71 \pm 40,7	101,09 \pm 4,01	68,99 \pm 42,47
50	4*	62,2 \pm 56,6	88,99 \pm 17,51	105,14 \pm 4,07

Tempo = Tempo in ore dopo l'iniezione monodose;

Giorno = Giorno di studio; SEM = Errore standard della media; ND = Non rilevato; NS = Nessun campione.

*Per Comparatore 2, giorno 50, n= tre a causa dell'incapacità di un campione di essere analizzato a

causa di problemi tecnici

H4H12166P, Comparatore 1 e Comparatore 2 hanno inibito l'attività emolitica del complemento terminale che sembrava correlata con le esposizioni di anticorpi. H4H12166P ha bloccato più dell'85% dell'attività emolitica fino al giorno 30 con l'attività che ritorna ai livelli basali pre-dose entro il giorno 50. Comparatore 1 e Comparatore 2 hanno bloccato circa l'80% dell'attività emolitica fino al giorno 20 e al giorno 10, rispettivamente, con il ritorno dell'attività ai livelli basali entro il giorno 30 per entrambi.

Esperimento 2

In questo esperimento, la farmacocinetica e la farmacodinamica degli anticorpi anti-C5 H4H12166P, H4H12161P, Comparatore 1 e un controllo di isotipo sono state valutate in topi C5 umanizzati (topi omozigoti per l'espressione di C5 umano). I livelli totali di C5 in circolo sono stati determinati usando un Human Complement C5 ELISA (Abcam, cat # ab125963), che è stato eseguito secondo le raccomandazioni del produttore. Le concentrazioni medie di C5 umano nei topi sono state determinate essere $48,98 \mu\text{g/ml} \pm 15,1 \mu\text{g/ml}$.

Prima del dosaggio dell'anticorpo, topi C5 umanizzati

maschi e femmine sono stati stratificati secondo livelli di C5 umani che erano in media di 50 µg/ml. Per ciascun mAb anti-C5, coorti di cinque topi hanno ricevuto una singola iniezione sottocutanea (s.c.) di 15 mg/kg di H4H12166P, H4H12161P, Comparatore 1 o un controllo di isotipo. Tutti i topi sono stati sottoposti a sanguinamento pre-dose, 6 ore, 1, 2, 3, 4, 7, 10, 13, 21, 30 e 45 giorni dopo l'iniezione per l'analisi di PK. Inoltre, il giorno 59, tutti i topi di ciascuna coorte sono stati sottoposti a eutanasia e sono stati raccolti sanguinamenti terminali per l'analisi di PK e PD. Il sangue è stato trasformato in siero e congelato a -80 °C fino all'analisi.

Le concentrazioni di anticorpi totali sono state determinate a 12 punti temporali e l'attività di emolisi percentuale è stata determinata a 1 punto temporale durante un periodo di vita di 59 giorni. Le concentrazioni nel siero totali di anticorpi per ciascun anticorpo anti-C5 sono riassunte nella Tabella 29. La concentrazione media di anticorpi totali rispetto ai profili temporali è mostrata nella FIG. 6. I parametri di PK medi sono descritti nella Tabella 30.

Tabella 29: Concentrazioni medie di IgG totali nel siero in seguito di una singola iniezione

sottocutanea di 15 mg/kg di anticorpi anti-C5
selezionati in topi C5 umanizzati

Tempo (giorno)	Concentrazione nel siero di Ab ($\mu\text{g/mL}$) Media \pm SD			
	H4H12166P	H4H12161P	Comparatore 1	Controllo di isotipo
0	ND	ND	ND	ND
0,25	31,2 \pm 4,2	43,5 \pm 16,3	59,2 \pm 24,1	61,5 \pm 29,4
1	149,9 \pm 16,1	193,8 \pm 24,1	179,0 \pm 9,8	218,1 \pm 17
2	160,8 \pm 20	221 \pm 26,5	166,6 \pm 22,3	188,8 \pm 25,8
3	166,2 \pm 12,4	210 \pm 31,2	159,2 \pm 33,2	177,9 \pm 26,2
7	158,6 \pm 8,5	162,5 \pm 34,8	136,1 \pm 38,1	184,9 \pm 33,9
10	123,5 \pm 28,7	133,2 \pm 20,2	107,2 \pm 45,7	159,5 \pm 28,8
13	93,7 \pm 23,6	97,2 \pm 24,6	70,6 \pm 38	117,2 \pm 24,1
21	60,4 \pm 14,9	42,4 \pm 30,3	29,5 \pm 20,6	80,0 \pm 17,5
30	37,8 \pm 10,8	15,3 \pm 19,7	4,2 \pm 3,5	42,1 \pm 6,7
45	20,7 \pm 5,2	3,5 \pm 5,2	0,4 \pm 0,3	16,5 \pm 13,9
59	4,1 \pm 1,9	0,6 \pm 1,0	0,08 \pm 0,04	4,6 \pm 4,5

Tempo = Tempo in ore dopo l'iniezione monodose;

Giorno = Giorno di studio; SD = Deviazione standard;

SEM = Errore standard della media; ND = Non rilevato;

NS = Nessun campione.

Tabella 30: Parametri PK

Parametro	Unità	Anticorpo di test (media \pm SD)			
		H4H12166P	H4H12161P	Comparatore 1	Controllo di isotipo
C_{max}	$\mu\text{g/ml}$	178 \pm 10	225 \pm 22	183 \pm 18	221 \pm 19
AUC_{last}	d. $\mu\text{g/ml}$	3490 \pm 590	3040 \pm 900	2240 \pm 780	4080 \pm 480
$t_{1/2}$	D	11 \pm 1	5,8 \pm 2	4,2 \pm 1	9,9 \pm 4

C_{max} = Concentrazione di picco; AUC = Area sotto la
curva concentrazione-tempo; AUC_{last} = AUC calcolata

dal tempo zero al tempo dell'ultima concentrazione positiva; $T_{1/2}$ = Emivita stimata osservata.

I profili di concentrazione media rispetto al tempo mostrano che H4H12166P, H4H12161P, Comparatore 1 e controllo di isotipo hanno raggiunto una concentrazione nel siero massima (C_{max}) tra i giorni da 1 a 3, con valori C_{max} comparabili entro 1,3 volte (178, 225, 183 e 221) $\mu\text{g/ml}$, rispettivamente. H4H12166P e il controllo di isotipo avevano profili di eliminazione simili, con livelli di farmaco rimanenti di circa 4 $\mu\text{g/ml}$ al giorno 59. H4H12161P ha mostrato una clearance più rapida rispetto a H4H12166P e al controllo di isotipo, ma è stato sottoposto a clearance più lentamente rispetto Comparatore 1. Al giorno 59, H4H12161P aveva un livello medio di farmaco nel siero di 0,6 $\mu\text{g/ml}$ mentre Comparatore 1 aveva un livello di farmaco quasi non rilevabile di 0,08 $\mu\text{g/ml}$.

Il controllo di isotipo, H4H12166P e H4H12161P hanno mostrato valori di esposizione comparabili (AUC_{last}) entro 1,3 volte (4080, 3490 e 3040 giorni $\cdot \mu\text{g/ml}$, rispettivamente) mentre Comparatore 1 ha mostrato un'esposizione 1,6 volte inferiore (2240 giorni $\cdot \mu\text{g/ml}$) rispetto a H4H12166P.

Esempio 12: Saggio basato su LC-MRM-MS per

determinare la concentrazione di C5 umano totale

In questo Esempio, le concentrazioni nel siero di C5 umano totale sono state determinate usando una cromatografia liquida accoppiata a un metodo di spettrometria di massa di monitoraggio di reazione multipla (LC-MRM-MS) in uno studio di farmacocinetica/farmacodinamica dell'anticorpo anti-C5 H4H12166P.

Le concentrazioni nel siero di C5 umano totale sono state determinate misurando la concentrazione di un peptide da 10-amminoacidi contenuto nella sequenza di C5 LQGTLPVEAR (aa 1129-1138 di SEQ ID NO: 359) come proxy per C5. Teoricamente, questo metodo potrebbe anche rilevare il prodotto di divisione di C5, C5b. Tuttavia, a causa dell'instabilità di C5b libero, le concentrazioni di C5b nel siero sono generalmente basse con la maggior parte di C5b che è legata alle superfici cellulari sotto forma di complessi MAC (Cooper e Muller-Eberhard 1970, J. Exp. Med. 132: 775-93; Hadders et al 2012, Cell Rep. 1: 200-7). Pertanto, è probabile che i campioni di siero trattati analizzati qui contengano solo quantità trascurabili di prodotto C5b, se presente.

Metodi

Per lo studio di PK/PD, i topi hanno ricevuto una

singola dose di 15 mg/kg di H4H12166P mediante iniezione sottocutanea (s.c.). Tutti i topi sono stati sottoposti a sanguinamento pre-dose e un giorno dopo l'iniezione per l'analisi di PK. Inoltre, a 10, 20, 30, 40, 50 e 60 giorni dopo l'iniezione, i topi sono stati sottoposti a eutanasia e sono stati raccolti sanguinamenti terminali per l'analisi di PK e PD.

C5 umano è stato usato come standard di riferimento per la calibrazione; e un peptide C5 umano prodotto con un residuo di arginina marcato con isotopo stabile C-terminale è stato usato come standard interno (LQGTLPVEAR-¹³C₆¹⁵N₄). Lo standard di riferimento è stato usato a concentrazioni che variano da 3,9 e 250 µg/ml (diluizioni seriali 1:2) nel siero di topi C5 knock-out generati in casa, in cui è stato deleto il gene C5 di topo (C5^{-/-}). Il siero di topi C5^{-/-} è stato usato anche come controllo negativo (bianco). Gli standard di calibrazione, i bianchi e i campioni di siero di studio (10 µl ciascuno) sono stati essiccati e poi denaturati in 100 µl di 8 M di urea/20 mM di tampone di Tris(2-carbossietil)fosfina (TCEP) a 37°C per 1 ora. Successivamente, 10 µl di standard interno 25 nM sono stati aggiunti a tutti i campioni. I campioni

sono stati alchilati con 10 mM di 2-iodoacetamide a temperatura ambiente per 30 minuti e sono stati diluiti usando bicarbonato di ammonio 50 mM fino a un volume finale di 500 μ l. I campioni sono stati poi digeriti mediante tripsina (1:20 p/p) durante la notte a 37°C. Il peptide triptico LQGTLPVEAR derivato da C5 è stato rilevato e quantificato mediante LC-MRM-MS usando un Waters Xevo TQ-S con sistema ACQUITY UPLC. Ciascun campione trattato (10 μ l) è stato iniettato su una colonna ACQUITY UPLC Beh C18 pre-equilibrata. La portata era di 0,6 ml/min (Fase mobile A:acqua: acido formico/100:0,1 [V:V] e Fase mobile B: acetonitrile: acido formico/100:0,1 [V:V]). Il tempo di ritenzione e l'area del picco sono stati determinati usando il software Masslynx Analyst Data (Waters). Le concentrazioni dell'analita C5 sono state calcolate dalla curva di calibrazione che è stata costruita tracciando il rapporto tra l'area di picco dello standard di riferimento C5 (peptide C5 non etichettato LQGTLPVEAR-¹²C₆¹⁴N₄ generato dal digestivo triptico di hC5) e lo standard interno (peptide C5 etichettato con isotopo stabile) rispetto alla concentrazione nominale dello standard di riferimento C5. Le concentrazioni sono state calcolate usando la regressione lineare. La

concentrazione più bassa dello standard di riferimento C5 (3,9 µg/ml) era all'interno dell'intervallo dinamico del saggio ed è stata definita come LLOQ del saggio.

Risultati

Le concentrazioni di C5 umano totale nel siero sono state valutate per i campioni raccolti e tramite sanguinamento della coda prima del dosaggio (pre-dose) e tramite sanguinamento terminale nei giorni 10, 30 e 35, dagli animali corrispondenti. Le concentrazioni totali di hC5 dopo la somministrazione di H4H12166P erano simili (da ~1 a 0,9 volte) ai livelli pre-dose nei giorni 10, 30 e 35 dopo la somministrazione. Le differenze minori osservate non erano statisticamente significative come valutato dal test di Mann-Whitney usando il software GraphPad Prism. L'analisi del rapporto molare C5/H4H12166P ha dimostrato che H4H12166P è rimasto in eccesso molare di C5 fino al giorno 35 dopo il dosaggio (Tabella 31).

Tabella 31: Sommario delle caratteristiche PD di

H4H12166P

Giorno	%CP	%	C5 (µg/mL)	H4H12166P	Rapporto

Dopo la dose	Emolisi Media±DS	Inibizione	Predose	Terminale	Cambiamento in volte	(µg/ml) media±SD	molare terminale C5: H4H12166P
0	77,2	0	n/d			n/a	n/a
10	5,2	93	34,2	30,0	1,0	78,8	0,3
30	7,4	90	31,9	28,4	0,9	30,4	0,8
35	6,0	92	36,1	32,7	1,0	29,6	0,9
40	37,1	52	n/d			20,9	n/d
50	Tutti gli animali del gruppo esclusi a causa di titoli MAHA > 1000						
60	73,57	5	n/d			5,9	n/d

^aLa percentuale di inibizione dell'attività emolitica di CP è stata calcolata dai valori medi di emolisi di CP % nel giorno indicato dopo la somministrazione rispetto al valore medio di emolisi di CP % nel giorno 0. ^bCambiamento in volte = terminale (giorno indicato dopo la somministrazione) C5: predose C5. SD = deviazione standard; MAHA = anticorpo anti-umano di topo; n/d = non determinato. Gli animali con dati impattati da MAHA sono stati completamente esclusi dai calcoli (2x giorno 30, 1x giorno 35, 2x giorno 40 e tutti e 4 i topi il giorno 50)

Esempio 13: Mappatura dell'epitopo del legame di H4H12166P a C5 mediante scambio di idrogeno/deuterio
È stata condotta la mappatura dell'epitopo a scambio H/D con spettrometria di massa per determinare i residui amminoacidici di hC5 [(amminoacidi M1-C1676

della SEQ ID No: 359) con cui interagisce H4H12166P. Una descrizione generale del metodo di scambio H/D è esposta per esempio in Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; e Engen e Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Gli esperimenti HDX-MS sono stati eseguiti su una piattaforma integrata Waters HDX/MS, costituita da un sistema Leaptec HDX PAL per l'etichettatura del deuterio, un Waters Acquity M-Class (gestore solvente ausiliario) per la digestione e il caricamento del campione, un Waters Acquity M-Class (gestore solvente μ Binary) per il gradiente analitico della colonna e uno spettrometro di massa Synapt G2-Si per la misurazione della massa peptidica del peptide.

La soluzione di etichettatura è stata preparata in 10 mM di tampone PBS in D₂O a pD 7,0 (equivalente a pH 6,6). Per l'etichettatura del deuterio, 3,8 μ l di C5 (6 pmol/ μ l) o C5 premiscelato con l'anticorpo in rapporto molare 1:1 sono stati incubati con 56,2 μ l di soluzione di etichettatura di D₂O per vari punti temporali (per esempio, controllo non deuterato = 0 sec, etichettato per 1 min e 20 min). Il deuterio è stato sottoposto a quenching trasferendo 50 μ l di campione in 50 μ l di tampone di quenching pre-raffreddato (0,2 M di TCEP, 6 M di cloruro di

guanidina in 100 mM di tampone fosfato, pH 2,5) e il campione misto è stato incubato a 1,0 °C per due minuti. Il campione sottoposto a quenching è stato poi iniettato in un Waters HDX Manager per la digestione inline di pepsina/proteasi XIII. I peptidi digeriti sono stati intrappolati su una precolonna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7- μ m, 2,1 \times 5 mm a 0°C ed eluiti su una colonna analitica ACQUITY UPLC BEH C18 1,7- μ m, 1,0 \times 50 mm per una separazione con gradiente di 9 minuti del 5%-40% di B (fase mobile A: 0,1% di acido formico in acqua, fase mobile B: 0,1% di acido formico in acetonitrile). Lo spettrometro di massa è stato impostato a una tensione conica di 37 V, un tempo di scansione di 0,5 s e un intervallo di massa/carica di 50-1700 unità Thomson (Th).

Per l'identificazione dei peptidi dal C5 umano, i dati di LC-MS^E dal campione non deuterato sono stati elaborati e ricercati nel database che include il C5 umano, la pepsina e la loro sequenza randomizzata tramite il software Waters ProteinLynx Global Server (PLGS). I peptidi identificati sono stati importati nel software DynamX e filtrati in base a due criteri: (1) prodotti minimi per amminoacido = 0,3 e (2) soglia file di replica = 3. Il software DynamX ha quindi determinato automaticamente l'assorbimento di

deuterio di ciascun peptide in base al tempo di ritenzione e all'elevata precisione di massa (<10 ppm) in più punti temporali con 3 repliche alla volta.

Usano la colonna di pepsina/proteasi XIII in linea accoppiata con l'acquisizione di dati di MS^E, sono stati identificati 189 peptidi totali da C5 umano in assenza o presenza dell'anticorpo, che rappresentano il 62% di copertura di sequenza. Cinque peptidi avevano un assorbimento di deuterazione significativamente ridotto (valori di delta del centroide > 0,9 dalton con valori p < 0,05) quando legati a H4H12166P e sono illustrati nella Tabella 32.

Tabella 32: Deuterizzazione dei peptidi C5 umani dopo il legame a H4H12166P

Residui	1 min deuterazione			20 min deuterazione		
	C5 Centroidi H ⁺	C5+H4H12166P Centroidi MH ⁺	Δ	C5 Centroidi MH ⁺	C5+H4H12166P Centroidi MH ⁺	Δ
591-599	1015,38±0,09	1014,44±0,16	-0,93	1015,64±0,04	1014,60±0,08	-1,04
593-599	769,41±0,11	768,33±0,05	-1,08	769,65±0,01	768,30±0,004	-1,35
775-787	1693,81±0,11	1692,85±0,07	-0,96	1694,06±0,04	1692,96±0,02	-1,10
775-794	2439,62±0,29	2438,42±0,20	-1,20	2440,16±0,06	2439,17±0,21	-0,99
779-787	1141,14±0,04	1140,21±0,05	-0,93	1141,23±0,03	1140,21±0,02	-1,02

La massa del peptide registrata corrisponde al valore medio della massa MH⁺ del centroide da tre repliche. Questi peptidi, corrispondenti agli amminoacidi 591-

599 e 775-794, avevano un tasso di deuterazione più lento dopo il legame a H4H12166P. Questi residui identificati corrispondono anche ai residui 591-599 e 775-794 di C5 umano come definito dall'entrata Uniprot P01031 (CO5_HUMAN; SEQ ID NO: 359).

Esempio 14: Effetto degli anticorpi anti-C5 sull'infiammazione oculare nell'uveite autoimmune sperimentale nei topi

Il presente studio è stato intrapreso per valutare il ruolo di C5 nell'uveite autoimmune sperimentale (EAU). Sono stati usati sia approcci sperimentali genetici [topi knockout (KO) C5, doppio KO C3/C5 KO], sia farmacologici (anticorpo anti-C5).

Metodi

Sono stati usati topi C57BL/6J adulti (n=25, laboratori Jackson), topi KO C5 (n=13) e KO C3/C5 (n=8) (Regeneron Pharmaceuticals Inc.). L'EAU è stata indotta mediante iniezione sottocutanea di peptide proteico legante il retinoide interfotorecettore umano (IRBP, New England Peptide) in adiuvante completo di Freund e iniezione intraperitoneale di tossina della pertosse. Il mAb anti-C5 di topo o il mAb di controllo di isotipo è stato somministrato attraverso iniezioni sottocutanee ogni 3 giorni dal giorno 5 al giorno 28. L'anticorpo anti-C5 di topo

usato in questo studio (M1M17628N) comprendeva una HCVR/LCVR delle SEQ ID NO: 362/363. SPECTRALIS® HRA+OCT (Heidelberg Engineering, Inc.) è stato usato per valutare i livelli di infiammazione nei giorni -1, 7, 14, 21 e 28. Tutti gli animali sono stati sottoposti a eutanasia il giorno 28 per la raccolta di occhi e sangue. Il saggio di emolisi con/senza C3 umano è stato eseguito per convalidare l'inibizione del complemento. I dati sono stati analizzati mediante ANOVA.

Risultati

Rispetto ai topi di tipo selvatico, la presenza di infiammazione (30-50%) e la conta dei cluster di cellule vitreali sono diminuite significativamente nei topi KO C5 ($p < 0,01$). Anche i punteggi della tomografia a coerenza ottica (OCT) nei topi KO C5 sono stati ridotti significativamente del 50% alla settimana 3 ($p < 0,0001$). È interessante notare che, nei topi a doppio KO C3/C5, c'erano significativamente più cluster di cellule vitreali e punteggi di malattia più elevati il giorno 28 rispetto ai topi di tipo selvatico ($p < 0,05$). Negli animali che hanno ricevuto Ab anti-mC5 (50 mg/kg), l'incidenza di infiammazione e i cluster di cellule vitreali sono stati significativamente inferiori

rispetto al gruppo di controllo di isotipo o senza trattamento il giorno 21 ($p < 0,01$). Alle settimane 3 e 4, i punteggi OCT nel gruppo trattato con anticorpi anti-C5 erano significativamente più bassi rispetto a nessun trattamento o controllo di isotipo ($p < 0,0001$). (FIG. 7) I saggi di emolisi con/senza C3 umano hanno confermato l'effetto di inibizione dell'anticorpo anti-C5 alla settimana 4 (FIG. 8).

Conclusione

L'infiammazione oculare dovuta all'EAU è stata mitigata inibendo l'attività di C5, mediante delezione genetica o inibizione farmacologica con uno specifico anticorpo anti-C5. La deplezione di C5 ha ritardato l'insorgenza di EAU e ha ridotto il punteggio della malattia di OCT. Questi risultati indicano che C5 è un potenziale bersaglio terapeutico per l'uveite autoimmune. L'anticorpo anti-C5 ha un effetto protettivo sulla malattia EAU nei topi di tipo selvatico. I nostri risultati suggeriscono anche che C3 potrebbe essere utile per la malattia EAU nei topi.

Esempio 15: Effetto degli anticorpi anti-C5 umano sull'uveite autoimmune sperimentale

Questo esempio descrive gli effetti degli anticorpi anti-C5 contro il C5 umano in un modello di topo di

uveite autoimmune sperimentale (EAU). I topi usati per questo studio sono stati umanizzati per esprimere la proteina C5 umana usando la tecnologia Velocigene® (Valenzuela et al 2003, Nat. Biotechnol. 21: 652-659). Topi umanizzati sono stati ingegnerizzati per sostituire l'esone 2 attraverso l'esone 41 del gene C5 murino con esoni 2 - 42 del gene C5 umano (divulgato nella pubblicazione di domanda di brevetto US 2015/0313194).

Metodi

Topi maschi adulti sono stati immunizzati per via sottocutanea in ciascuna coscia con 150 µg di peptide 1-20 della proteina legante il retinoide interfotorecettore umano (IRBP) (GPTHLEFQPSLVLDMAKVLLD) (SEQ ID NO: 364) (Avichezer et al 2000, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41:127-131) in 0,2 ml di emulsione di CFA, integrata con *Mycobacterium tuberculosis* ceppo H37RA a 2,5 mg/ml. I topi sono stati poi inoculati per via intraperitoneale con 1,0 µg di tossina della pertosse (PTX) per facilitare l'induzione di autoimmunità cellulo-mediata promuovendo una polarizzazione di Th1 della risposta immunitaria (Thurau et al 1997, Clin. Exp. Immunol. 109: 370-376; Silver et al 1999, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40: 2898-2905). I pesi

corporei degli animali sono stati monitorati due volte alla settimana.

Gli esami oftalmici sono stati eseguiti il giorno -1, prima dell'induzione di EAU e nei giorni 7, 14, 21 e 28. I topi sono stati anestetizzati con chetamina (120 mg/kg, IP) e xilazina (5 mg/kg, IP). Le pupille sono state dilatate usando una soluzione oftalmica allo 0,5% di Tropicamide e il fondo dell'occhio è stato esaminato usando una lente a contatto con una telecamera del fondo in una piattaforma di angiografia retinica Spectralis Heidelberg (HRA) + sistema OCT (Heidelberg Engineering, Carlsbad, CA, USA).

Una serie di 61 sezioni ottiche laterali sono state ottenute per ciascun occhio usando la funzione OCT sul sistema Spectralis HRA + OCT (Heidelberg Engineering, Carlsbad, CA, USA). L'area di imaging OCT è stata centrata sul disco ottico consentendo un'immagine uguale sopra e sotto la testa del nervo ottico. Lo spessore retinico è stato misurato come la distanza tra il fondo dello strato di RPE e la membrana limitante interna dell'occhio. Le misurazioni sono state prese a 1500 μm dal disco ottico e i valori di 4 differenti quadranti retinici (per esempio, superiore, inferiore, temporale e

nasale) sono stati mediati per uno spessore retinico medio dell'occhio.

La gravità dell'infiltrazione di cellule infiammatorie nel vitreo è stata anche classificata nelle immagini OCT, valutando il numero medio di cluster di cellule infiammatorie nel vitreo, in quattro scansioni OCT laterali che hanno transezionato il nervo ottico, per occhio.

Una scala a 4 punti è stata sviluppata per la valutazione della gravità della malattia nelle immagini OCT (punteggi OCT) (Tabella 33).

Tabella 33: Punteggio EAU in vivo usando la Tomografia a coerenza ottica (OCT)

Grado	Criteri
0	Nessun cambiamento
0,5 (Tracce)	Infiltrazione minore di cellule infiammatorie nel vitreo, principalmente vicino alla testa del nervo ottico (<15 cluster)
1	Infiltrazione minore di cellule infiammatorie minori nel vitreo, principalmente vicino alla testa del nervo ottico (<25 cluster); lesioni subretiniche focali minori (macchie grigie) nella periferia; pieghe retiniche minori nella periferia; dilatazione vascolare retinica; perivasculite e vasculite
2	Moderata infiltrazione di cellule infiammatorie nel vitreo più diffuso ma non nella periferia lontana (<50 cluster); interruzioni dello strato retinico; formazioni di granuloma di piccole e medie dimensioni con pieghe retiniche principalmente nella periferia; dilatazione dei vasi; neovascolarizzazione coroideale focale minore; perivasculite e vasculite; edema retinico minore (<10 µm)

3	Infiltrazione di cellule infiammatorie diffuse da moderata a grave nel vitreo (>50 cluster); interruzioni dello strato retinico diffuso e vasi dilatati nello strato nucleare interno; formazioni di granuloma da medio a grande con pieghe retiniche in tutta la retina; grave dilatazione vascolare retinica; perivasculite e vasculite; neovascolarizzazione coroideale diffusa moderata; edema retinico da moderato a grave (10-40 μm); distacchi retinici minori
4	Grave infiltrazione di cellule infiammatorie diffuse nel vitreo (>70 cluster); interruzioni dello strato diffuso e vasi dilatati nello strato nucleare interno; formazione di granuloma diffuso grave con pieghe retiniche; neovascolarizzazione coroideale diffusa grave; perivasculite e vasculite; degenerazione retinica o edema retinico grave (perdita >20 μm o guadagno >40 μm rispettivamente); grandi distacchi retinici

Analisi statistica

Le analisi statistiche per i dati parametrici (peso corporeo, cluster di cellule infiammatorie nel vitreo e spessore retinico) sono state eseguite mediante test ANOVA a una via e test di confronto multiplo di Tukey. Per i dati non parametrici (punteggi OCT e punteggi istologici) le analisi sono state eseguite mediante il test di Kruskal-Wallis e il test di Dunn con il software GraphPad Prism versione 5.0d relativo al controllo di isotipo o ai gruppi senza trattamento. I dati mostrano valori medi \pm SEM. Un valore p minore di 0,05 è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati

In un primo studio (Studio A), i topi sono stati

trattati per via sottocutanea ogni 3 giorni dal giorno 5 con anticorpo di controllo di isotipo (50 mg/kg), o 10 mg/kg o 50 mg/kg di H4H12170P. Il trattamento con 10 mg/kg di H4H12170P ha determinato una riduzione dell'inflammatione e del danno retinico (FIG. 9). I topi trattati con 10 mg/kg di H4H12170P hanno anche mostrato una riduzione statisticamente significativa dei punteggi OCT il giorno 21 e il giorno 28 (FIG. 10).

In un secondo studio (studio B), i topi sono stati trattati per via sottocutanea ogni 3 giorni dal giorno 6 con controllo di isotipo (10 mg/kg), 3 mg/kg o 10 mg/kg di H4H12166P, o con Comparatore 2 (si veda l'Esempio 2 nella presente; "Costrutti di controllo usati negli Esempi seguenti"). Il trattamento con H4H12166P a 3 mg/kg o 10 mg/kg ha prodotto una riduzione dose-correlata nei punteggi OCT che era statisticamente significativa nei giorni da 14 a 28 (FIG. 11). Il trattamento con 10 mg/kg di H4H12166P in topi C5 umanizzati a partire da 6 giorni dopo l'induzione di EAU ha determinato una riduzione dose-correlata dell'inflammatione e del danno retinico come determinato dall'OCT ottenuto dal giorno 14 al giorno 28 (FIG. 12).

Per entrambi gli studi, la valutazione non invasiva

in vita mediante OCT ha mostrato un progressivo sviluppo di infiammazione, aumento dello spessore retinico e anomalie morfologiche negli animali di controllo dopo l'immunizzazione con IRBP.

Conclusione

Questi esperimenti forniscono ulteriori prove farmacologiche che C5 svolge un ruolo nella patogenesi dell'uveite autoimmune. La deplezione farmacologica di C5 umano da parte di anticorpi anti-C5 umano completamente umani ha rinviiato l'incidenza di EAU e ridotto la gravità della malattia, stabilendo l'efficacia di questi anticorpi nell'uveite autoimmune.

Esempio 16: Effetto degli anticorpi anti-C5 sulla lesione da ischemia-riperfusione renale

Il presente studio è stato condotto per valutare il ruolo di C5 nella lesione da ischemia-riperfusione renale. Sono stati usati sia approcci genetici (usando topi knockout C3 e knockout C5) che farmacologici (usando anticorpi anti-C5). Il modello di ischemia-riperfusione è stato indotto mediante serraggio bilaterale del peduncolo renale per 45 minuti seguito da 48 ore di riperfusione. La laparotomia simulata è servita da controllo. L'anticorpo anti-C5 è stato somministrato a 50 mg/kg

per via intravenosa come dose singola immediatamente dopo l'ischemia (curativa); o per via sottocutanea come due dosi, giorno -1 e giorno 1 chirurgia (preventiva). L'anticorpo anti-C5 usato per questo studio era M1M17628N comprendente HCVR/LCVR della SEQ ID NO: 362/363. I marcatori di azoto ureico nel sangue (BUN) e creatinina nel siero sono stati usati per valutare i livelli di malattia e protezione nei topi.

Tabella 34: Cambiamento percentuale dei livelli di azoto ureico nel sangue nei topi trattati con anticorpo anti-C5 (M1M17628N) in modalità preventiva e terapeutica

BUN, % Cambiamento Vs.	RIRI + Vei	RIRI + Iso. Ctl
	Giorno 2	Giorno 2
RIRI + M1M17628N (Prev)	-37,19	-34,68
RIRI + M1M17628N (Cur)	- 53,70	-51,85

Tabella 35: Cambiamento percentuale dei livelli di creatinina nel siero nei topi trattati con anticorpo anti-C5 (M1M17628N) in modalità preventiva e terapeutica

SCr, % Cambiamento Vs.	RIRI + Vei	RIRI + Iso. Ctl
	Giorno 2	Giorno 2
RIRI + M1M17628N (Prev)	-53,09	-49,34
RIRI + M1M17628N (Cur)	-59,40	-56,16

Rispetto ai topi di tipo selvatico, i topi knockout

C3 e C5 hanno mostrato una significativa protezione funzionale nel modello RIRI di lesione renale acuta, come evidenziato dalla riduzione dei livelli di azoto ureico nel sangue e di creatinina nel siero. L'anticorpo anti-C5 ha mostrato protezione funzionale nel modello RIRI sia in modalità preventiva che terapeutica (Tabelle 34-35).

Esempio 17: Effetto degli anticorpi anti-C5 sulla nefrite da lupus

Questo esempio descrive l'efficacia degli anticorpi anti-C5 nel trattamento della nefrite da lupus in un modello di topo.

Il lupus eritematoso sistemico (SLE) è una malattia autoimmune causata dalla perdita di tolleranza agli autoantigeni, dalla produzione di autoanticorpi e dalla deposizione di complessi immunitari che fissano il complemento (IC) nei tessuti feriti. Lo SLE è caratterizzato da un'ampia gamma di manifestazioni cliniche e organi mirati, con la nefrite da lupus che è una delle complicanze più gravi. L'attivazione del complemento nei reni dei pazienti con nefrite da lupus contribuisce all'infiammazione e al danno tissutale. L'efficacia degli anticorpi anti-C5 nel trattamento della nefrite da lupus è stata studiata nei topi NZBWF1, un modello di topo spontaneo di

nefrite da lupus (Yang et al 1996, PNAS). I topi sviluppano una malattia autoimmune simile allo SLE umano, autoanticorpi agli antigeni nucleari e alle proteine della membrana cellulare, ipergammaglobulinemia, albuminuria, proteinuria, iniziano la glomerulonefrite del complesso immunitario e muoiono di insufficienza renale e malattia renale allo stadio terminale a 35-50 settimane di età.

Per questo studio, topi NZBWF1 di 25 settimane sono stati trattati per via sottocutanea con 30 mg/kg di controllo di isotipo, o anticorpi anti-C5 due volte a settimana per 8 settimane seguite da tre volte a settimana per 10 settimane. Gli anticorpi anti-C5 di topo usati per questo studio erano M1M17628N e M1M17627N, comprendenti HCVR/LCVR delle SEQ ID NO: 362/363 e 365/366, rispettivamente.

Il trattamento con anticorpi anti-C5 ha migliorato significativamente il tasso di sopravvivenza nei topi (FIG. 13). Entrambi gli anticorpi hanno migliorato l'albuminuria a 8-14 settimane di trattamento (FIG. 14) e i livelli di azoto ureico nel sangue a 12-16 settimane di trattamento (FIG. 15).

Esempio 18: Effetto degli anticorpi anti-C5 contro la morte delle cellule astrociti

La neuromielite ottica (NMO) è una malattia autoimmune del sistema nervoso centrale (CNS) che colpisce principalmente il nervo ottico e il midollo spinale. Nella NMO, gli autoanticorpi anti-aquaporina-4 (AQP4-Ab) causano danni agli astrociti attivando citotossicità dipendente dal complemento (CDC). Gli obiettivi di questo studio erano valutare il ruolo del sistema del complemento nella progressione dell'NMO e l'uso di un anticorpo contro una proteina del complemento come potenziale trattamento terapeutico per l'NMO.

Astrociti corticali di ratto primari sono stati ottenuti dalla corteccia cerebrale di cuccioli di ratto post-natali e sono stati coltivati con AQP4-Ab (anticorpo "rAb-53" dalla pubblicazione di domanda di brevetto US 2014/0170140; Bennett et al 2009, Ann. Neurol. 66: 617-629) e proteine del complemento per dimostrare la citotossicità cellulo-mediata. Poi gli esperimenti sono stati ripetuti con l'aggiunta di un anticorpo anti-C5 per dimostrare il blocco della distruzione delle cellule astrociti.

Per quantificare la morte cellulare, è stato eseguito un saggio di citotossicità con luminescenza CytoTox-Glo™. Il saggio ha usato varie concentrazioni di anticorpo anti-C5 (0,001µg/ml, 0,01µg/ml, 0,1µg/ml,

1µg/ml, 10µg/ml, 100µg/ml o 1000µg/ml) o un anticorpo di controllo di isotipo.

Al fine di determinare se l'anticorpo anti-C5 potesse bloccare la CDC indotta da AQP4-Ab, sono stati piastrati gli astrociti e il saggio di citotossicità CytoTox-Glo™ è stato ripetuto per trovare una dose ottimale di AQP4-Ab per quella placcatura. La concentrazione ottimale di AQP4-Ab è risultata essere di 50 µg/ml, e in un esperimento successivo è stata usata una dose costante di AQP4-Ab (50 µg/ml), mentre la dose di anticorpo anti-C5 è stata variata. Come mostrato nella FIG. 16, è stata osservata una diminuzione di RLU (in media da 300k a in media 100k) con quantità crescenti di anticorpo anti-C5 che dimostrano che l'anticorpo anti-C5 ha bloccato la morte delle cellule astrociti. Per entrambi gli esperimenti, l'RLU non è variata con l'anticorpo di controllo di isotipo. Come mostrato nella FIG. 16, gli anticorpi anti-C5 hanno inibito la citotossicità indotta da AQP4 Ab su astrociti corticali primari con IC50 di 15-17 nM.

In uno studio successivo, l'anticorpo anti-AQP4 e l'anticorpo anti-C5 saranno iniettati nel cervello di ratto per valutare l'efficacia terapeutica contro la citotossicità mediata dal complemento degli astrociti

nel CNS.

Esempio 19: Saggio endoteliale

Questo esempio descrive un saggio endoteliale glomerulare in vitro per esaminare se gli anticorpi anti-C5 bloccano la deposizione di C5b-9 e C3.

Metodi riproducibili per valutare gli effetti inibitori dei candidati farmaci sull'attivazione del complemento sono essenziali per lo sviluppo preclinico. A causa della complessità delle vie di attivazione del complemento, un saggio dovrebbe usare cellule ed endpoint rilevanti per la data indicazione terapeutica. Qui, usando una linea cellulare endoteliale glomerulare umana immortalizzata (HGEC), è stato convalidato un modello di deposizione di C3 e C5 del complemento per l'uso che valuta l'attività bloccante degli mAb anti-C3 o C5.

Metodi

Le cellule endoteliali glomerulari renali primarie umane (HGEC; Cell Biologics) sono state piastrate durante la notte in terreni completi in piastre a 96 pozzetti con fondo trasparente nero rivestito di collagene I. Le cellule sono state trattate con PBS (controllo) o attivate per 10 minuti con ADP 10 μ M. Dopo il lavaggio con PBS, è stato aggiunto il 50% di siero umano (conservato con complemento, depleto di

C3 o depleto di C5) per 4 ore. Anticorpi anti-C5 sono stati aggiunti a 1 mg/ml al siero prima del trattamento. Le cellule sono state lavate e fissate e sondate con anticorpi anti-C3b (Thermofisher) e/o anticorpi anti-C5b-9 (Abcam), anticorpi secondari e controcolorate con DAPI. Le immagini sono state acquisite su ImagExpress e l'analisi di immagini ad alto contenuto è stata usata per quantificare la colorazione fluorescente per ciascuna immagine e mediate per condizione.

Risultati

È stata osservata deposizione di C3 e C5b-9 su HGEC attivati da ADP esposti a siero umano normale ma non su HGEC non attivati (C3: $1,5 \times 10^7 \pm 1,0 \times 10^7$; C5: $7,9 \times 10^6 \pm 6,6 \times 10^6$, $P < 0,05$ rispetto a HGEC non attivato da ADP). La deposizione di C3 e C5b-9 è stata significativamente ridotta su HGEC attivato da ADP esposto a siero depleto di C3 o C5 (C3: $3,3 \times 10^5 \pm 4,8 \times 10^4$; C5: $1,5 \times 10^6 \pm 6,0 \times 10^5$, $P < 0,05$). L'aggiunta di un mAb anti-C5 bloccante ha ridotto significativamente la deposizione di C5b-9 derivato da siero umano normale su HGEC attivato da ADP, la deposizione era paragonabile a sieri depleti di C5 (mAb C5: $1,02 \times 10^6 \pm 6,0 \times 10^5$, mAb di controllo $3,7 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^6$, $P < 0,05$ rispetto a mAb di controllo).

Conclusione

Questi dati dimostrano l'utilità di un saggio endoteliale glomerulare umano *in vitro* per modellare la deposizione di C3 e C5 del complemento. Oltre allo screening *in vitro*, questo saggio offre il potenziale come modello traslazionale per valutare strategie anti-complemento nella malattia renale usando campioni di siero derivati da pazienti.

SEQUENZE

SEQ ID NO: 13	aaggcgtct
SEQ ID NO: 14	Lys Ala Ser
SEQ ID NO: 29	gatgcatcc
SEQ ID NO: 30	Asp Ala Ser
SEQ ID NO: 45	aaggcgtct
SEQ ID NO: 46	Lys Ala Ser
SEQ ID NO: 61	gctgcatcc
SEQ ID NO: 62	Ala Ala Ser
SEQ ID NO: 77	gctgcatcc
SEQ ID NO: 78	Ala Ala Ser
SEQ ID NO: 93	gatgcatcg
SEQ ID NO: 94	Asp Ala Ser
SEQ ID NO: 109	gctgcatcc
SEQ ID NO: 110	Ala Ala Ser
SEQ ID NO: 117	gctgcatcc
SEQ ID NO: 118	Ala Ala Ser
SEQ ID NO: 133	gctgcatcc
SEQ ID NO: 134	Ala Ala Ser
SEQ ID NO: 165	actgcatcc
SEQ ID NO: 166	Thr Ala Ser
SEQ ID NO: 181	actgcatcc
SEQ ID NO: 182	Thr Ala Ser
SEQ ID NO: 197	gatgcatcc
SEQ ID NO: 198	Asp Ala Ser
SEQ ID NO: 213	aaggcgtct
SEQ ID NO: 214	Lys Ala Ser
SEQ ID NO: 229	gctgcatcc
SEQ ID NO: 230	Ala Ala Ser
SEQ ID NO: 245	gatgcatcc
SEQ ID NO: 246	Asp Ala Ser
SEQ ID NO: 261	gctgcatcc
SEQ ID NO: 262	Ala Ala Ser

SEQ ID NO: 301	gctgcatcc
SEQ ID NO: 302	Ala Ala Ser
SEQ ID NO: 317	gatgcatcc
SEQ ID NO: 318	Asp Ala Ser
SEQ ID NO: 333	ggtgcatcc
SEQ ID NO: 334	Gly Ala Ser
SEQ ID NO: 349	gatgcatcc
SEQ ID NO: 350	Asp Ala Ser

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per produrre un anticorpo o suo frammento di legame di antigene che si lega specificamente alla proteina del fattore di complemento 5 (C5), e comprende una regione variabile di catena pesante (HCVR) comprendente la sequenza amminoacidica come esposto nella SEQ ID NO: 98 e una regione variabile di catena leggera (LCVR) comprendente la sequenza amminoacidica esposta nella SEQ ID NO: 106;

in cui il metodo comprende coltivare una cellula ospite comprendente una o più molecole di acido nucleico che codificano HCVR o LCVR dell'anticorpo o del frammento di legame di antigene in condizioni che permettono la produzione dell'anticorpo o del frammento di legame di antigene.

2. Metodo della rivendicazione 1, comprendente inoltre recuperare l'anticorpo o il frammento di legame di antigene dalla cellula ospite.

3. Metodo della rivendicazione 1 o 2, in cui l'anticorpo o il suo frammento di legame di antigene comprende una catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 353.

4. Metodo della rivendicazione 1 o 2, in cui l'anticorpo o il frammento di legame di antigene comprende una catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 354.

5. Metodo della rivendicazione 1 o 2, in cui l'anticorpo o il suo frammento di legame di antigene comprende una catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 353; e una catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica esposta nella SEQ ID NO: 354.

6. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, in cui le una o più molecole di acido nucleico che codificano HCVR e LCVR comprendono:

una sequenza nucleotidica come esposto in SEQ ID NO:
99,

una sequenza nucleotidica come esposto in SEQ ID NO:
101,

una sequenza nucleotidica come esposto in SEQ ID NO:
103,

una sequenza nucleotidica come esposto in SEQ ID NO:
107,

una sequenza nucleotidica come esposto in SEQ ID NO: 109, e

una sequenza nucleotidica come esposto in SEQ ID NO: 111.

7. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, in cui le una o più molecole di acido nucleico che codificano HCVR e LCVR comprendono una sequenza nucleotidica come esposto in SEQ ID NO: 97.

8. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, in cui una o più molecole di acido nucleico che codificano HCVR e LCVR comprendono una sequenza nucleotidica come esposto in SEQ ID NO: 105.

9. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, in cui le una o più molecole di acido nucleico che codificano HCVR e LCVR comprendono una sequenza nucleotidica come esposto in SEQ ID NO: 97 e una sequenza nucleotidica come esposto in SEQ ID NO: 105.

10. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-9, in cui la cellula ospite è una cellula ovarica di criceto cinese (CHO).

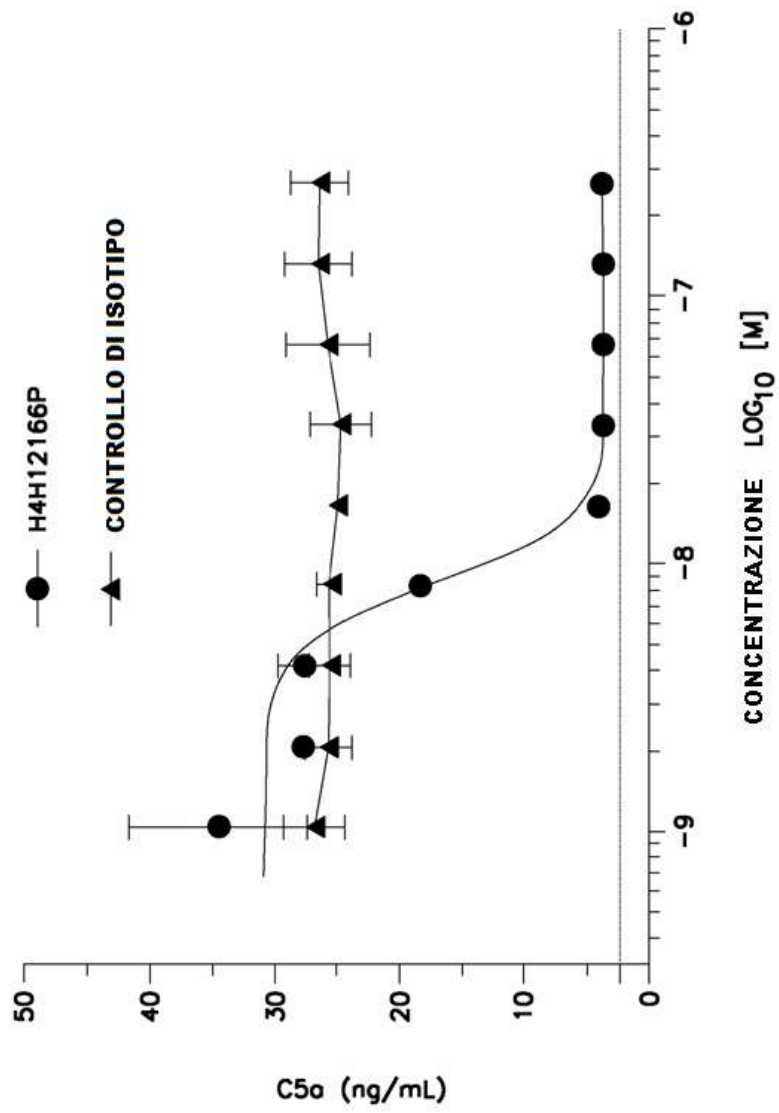


FIG. 1

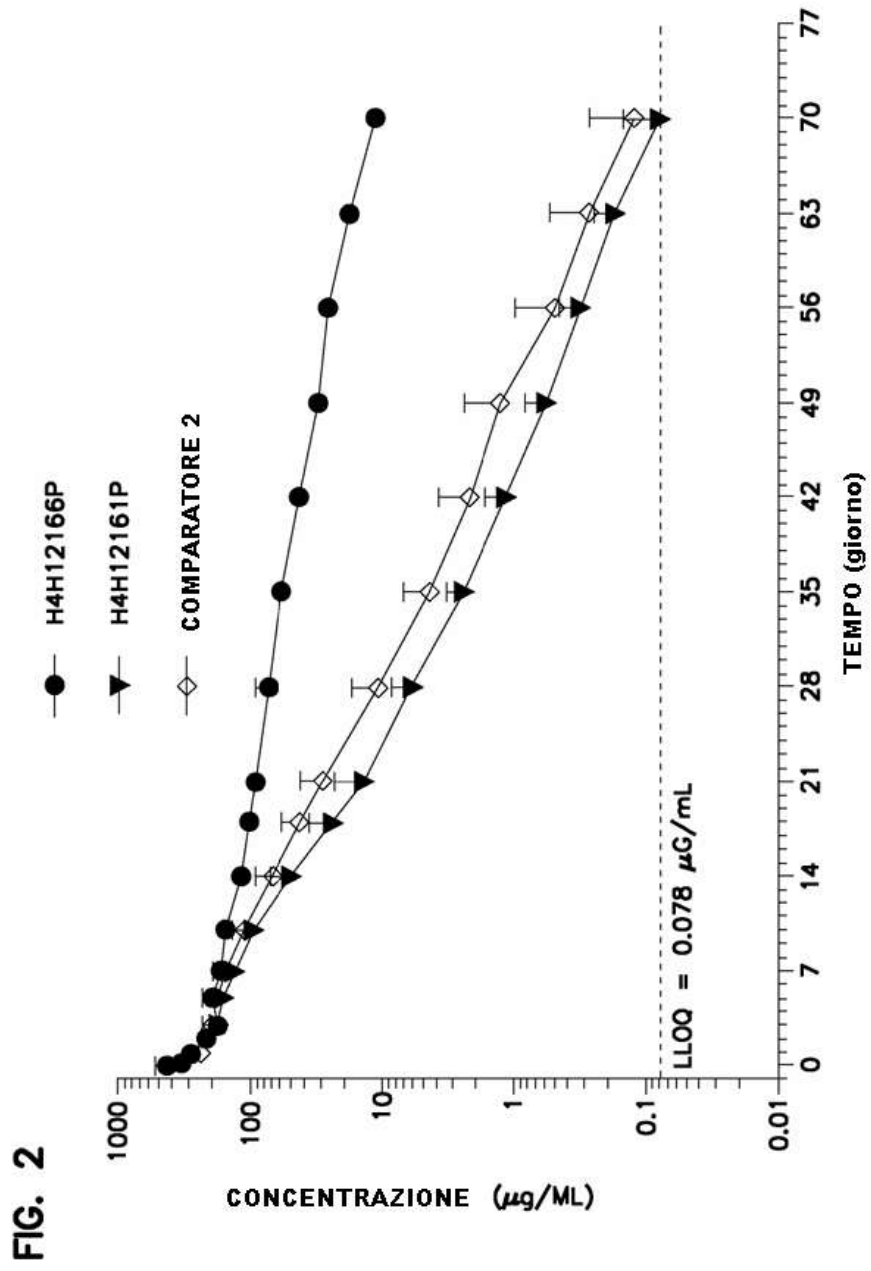


FIG. 3A

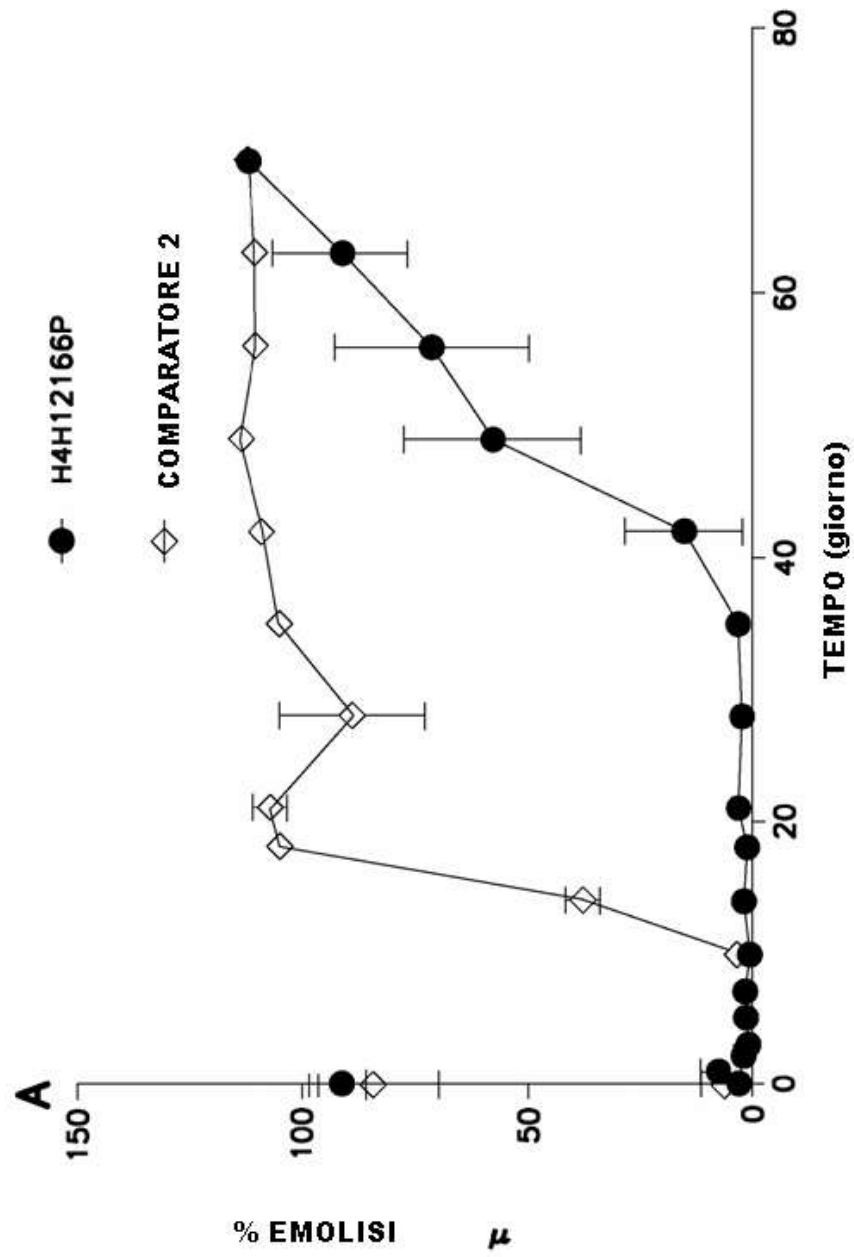


FIG. 3B

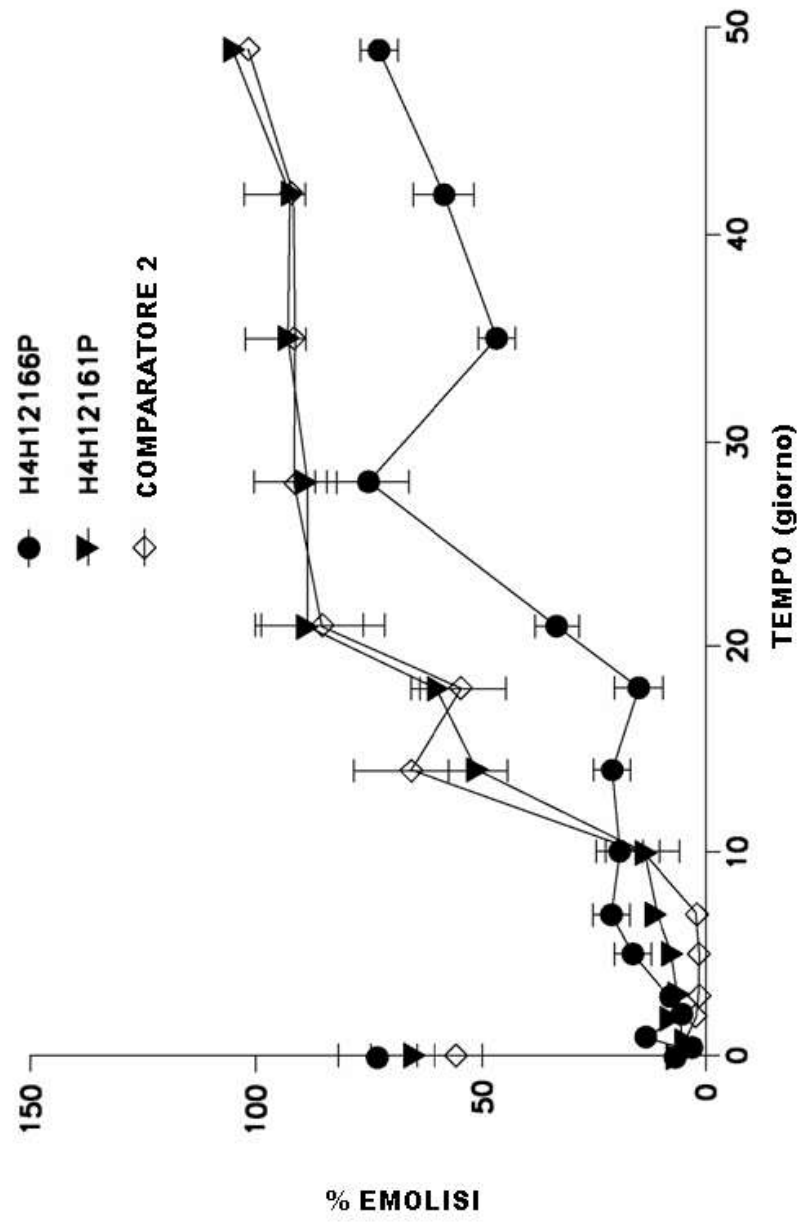


FIG. 4

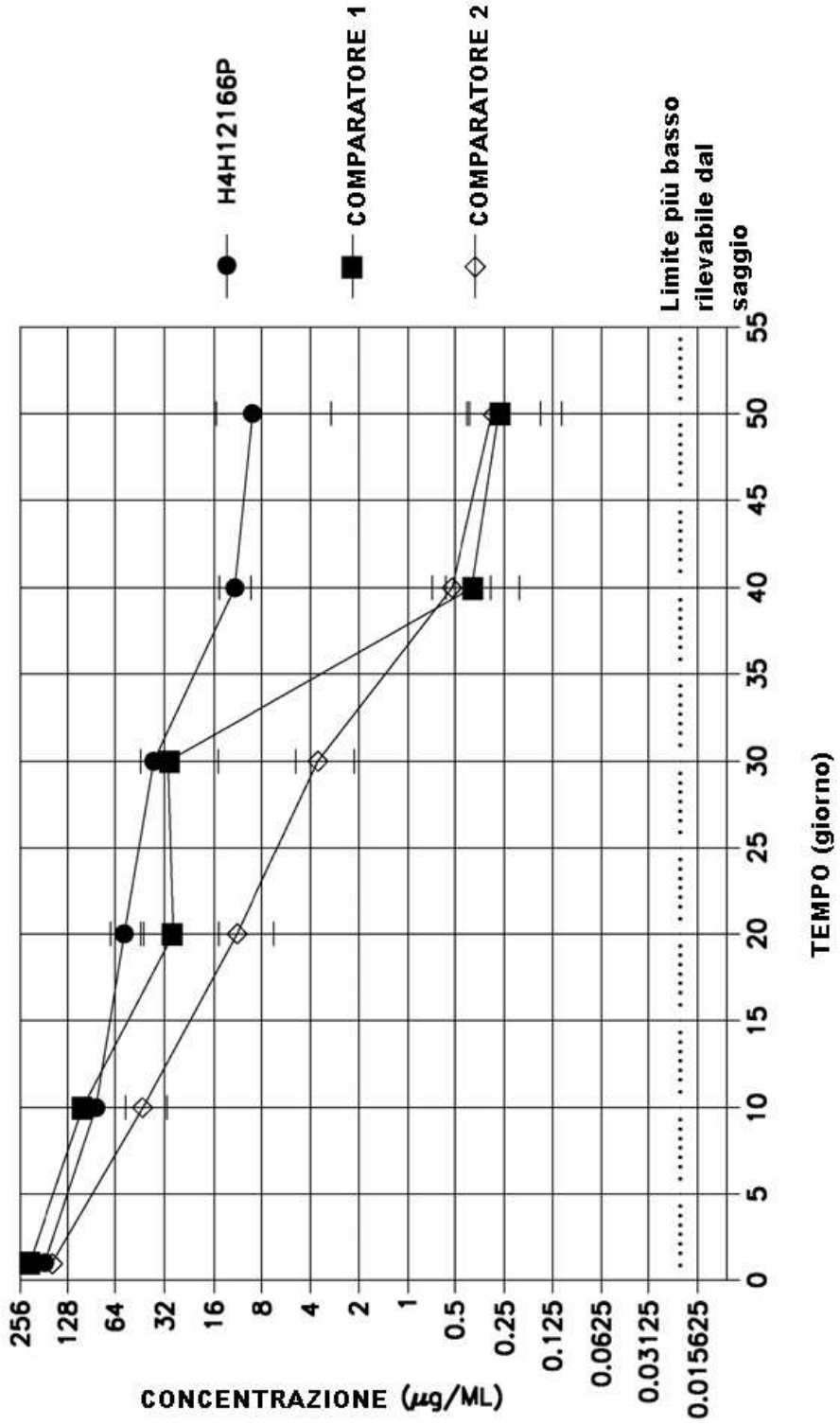


FIG. 5

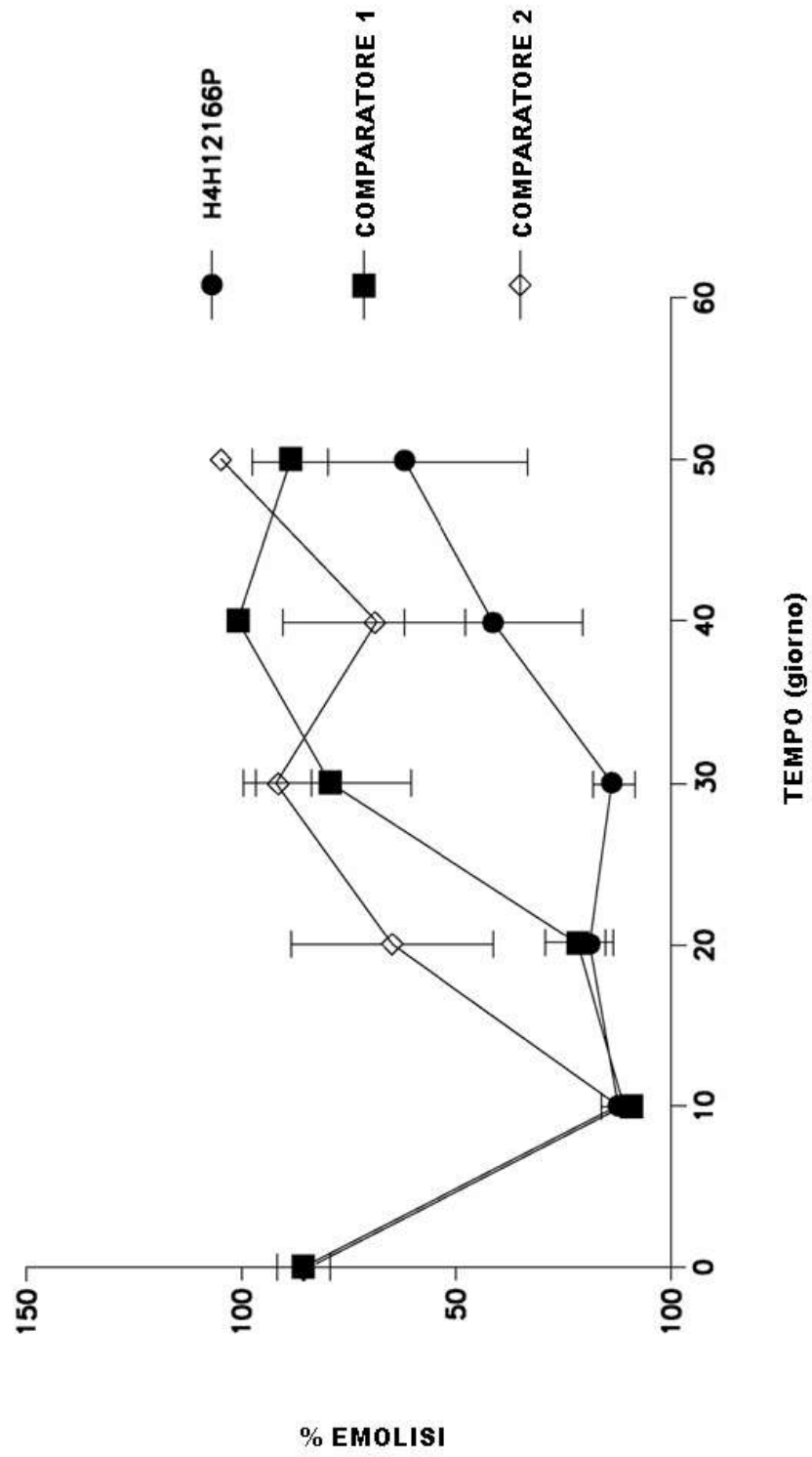


FIG. 6

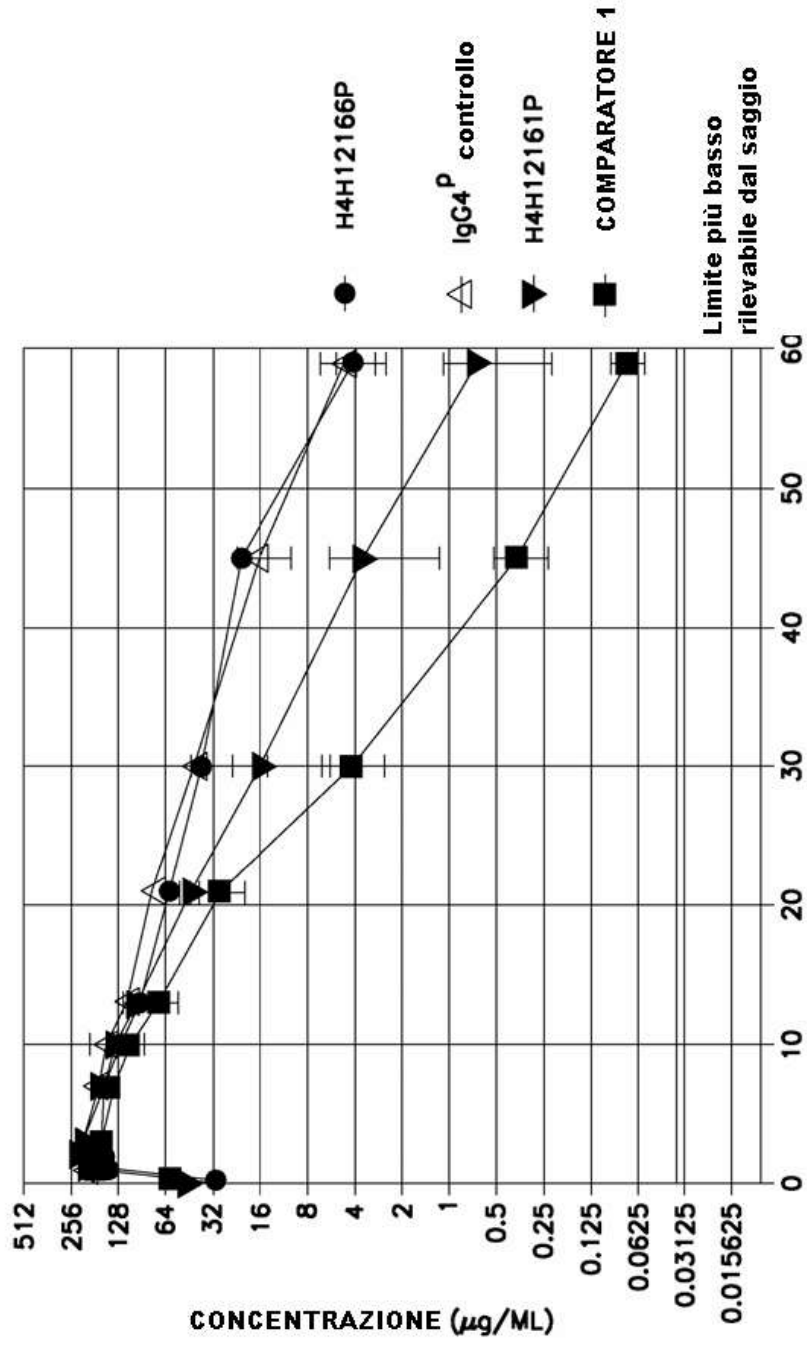


FIG. 7

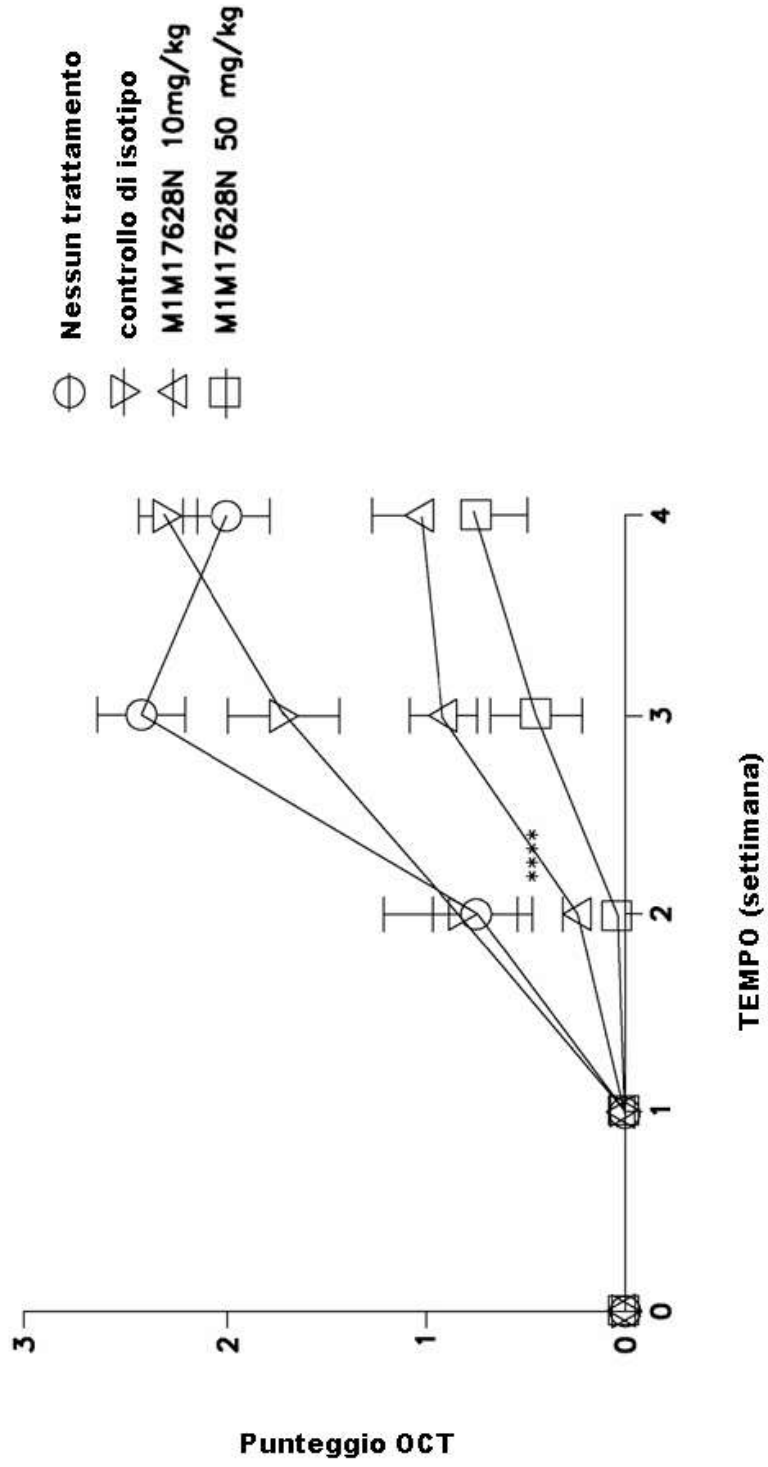


FIG. 8B

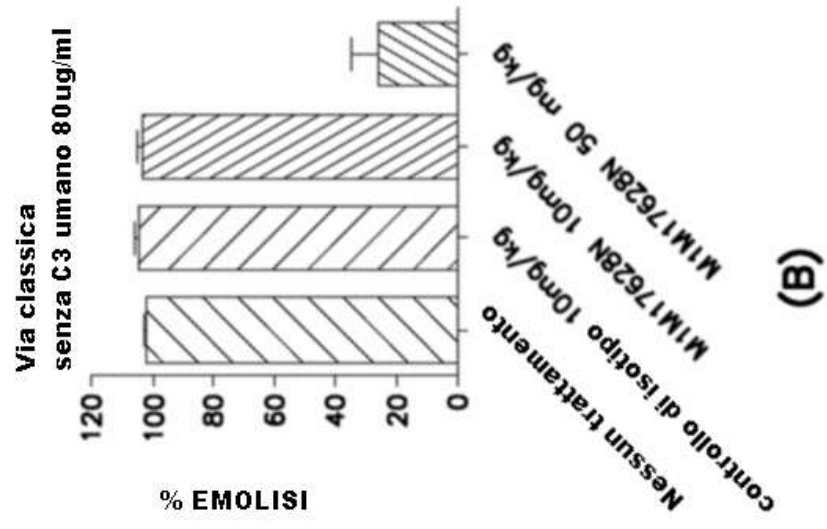


FIG. 8A

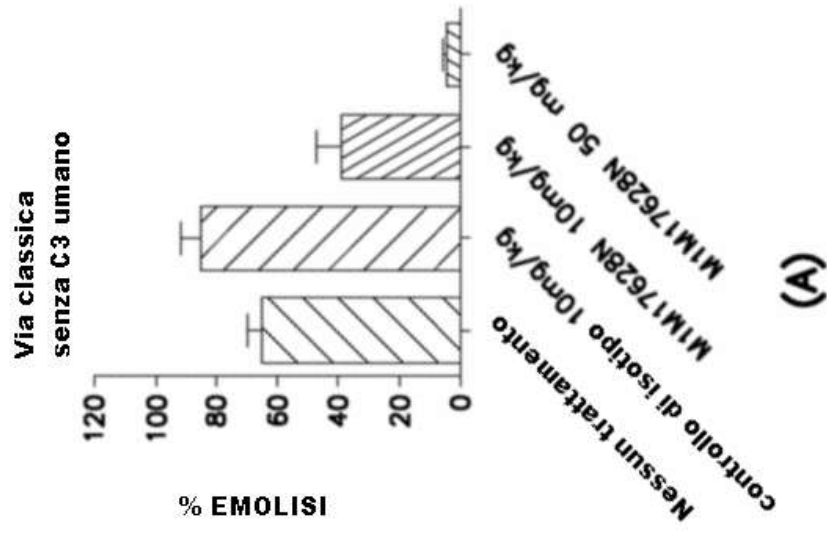


FIG. 9

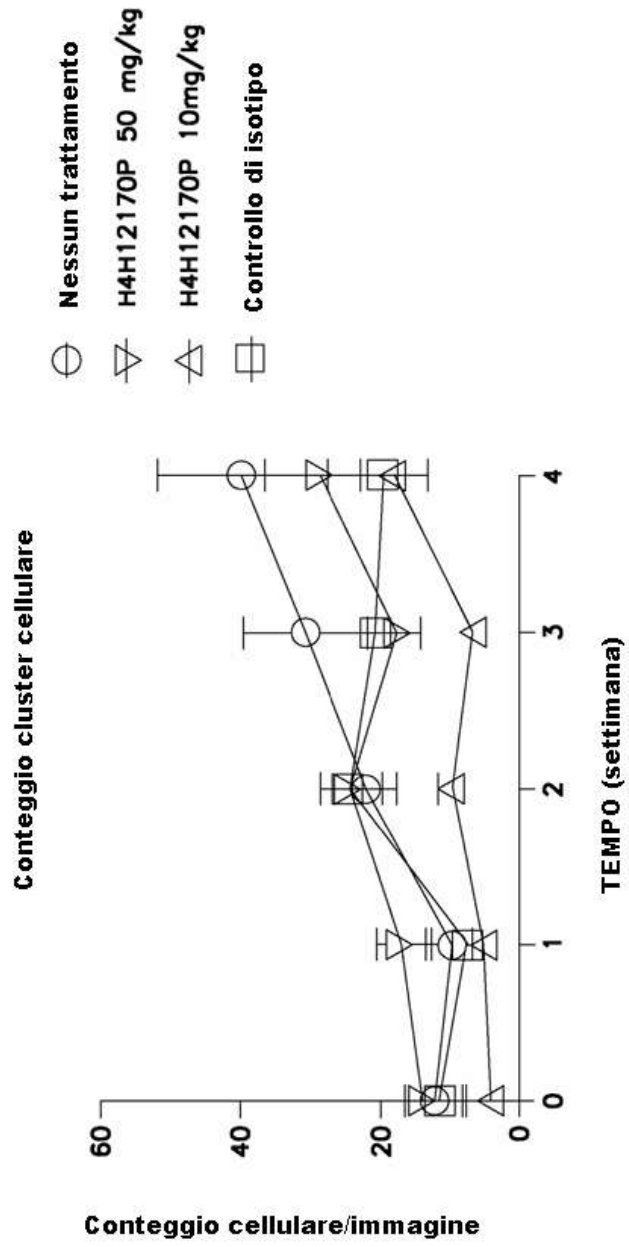


FIG. 10

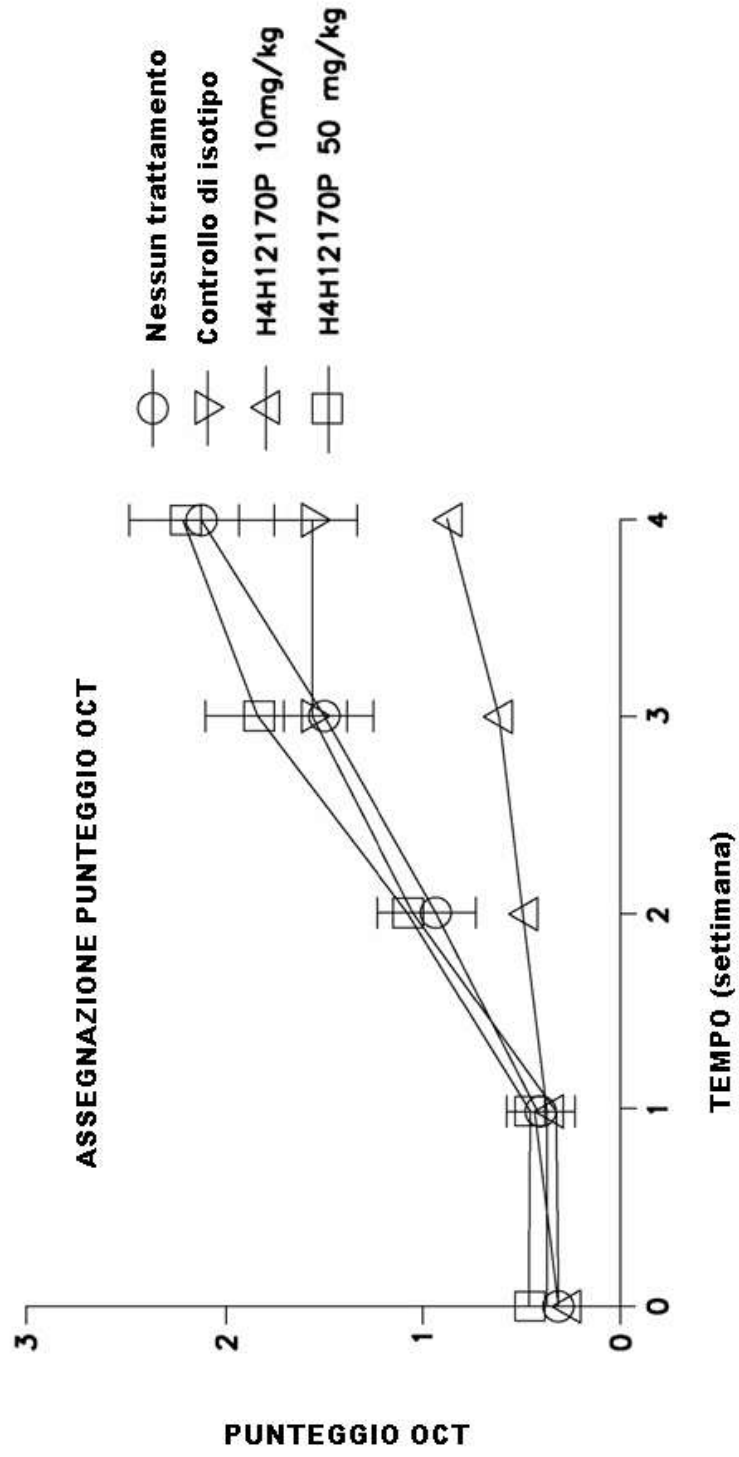


FIG. 11

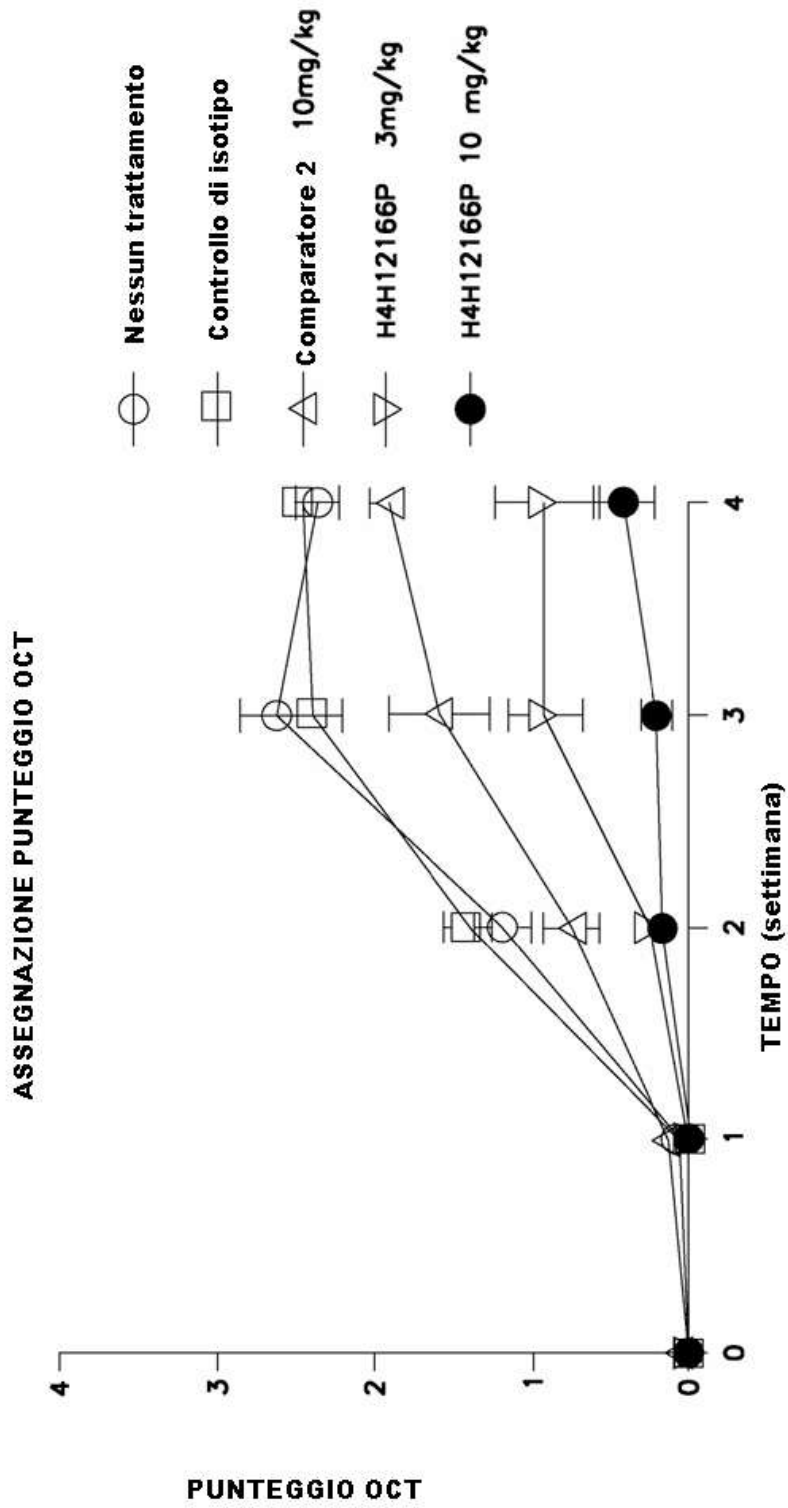


FIG. 12

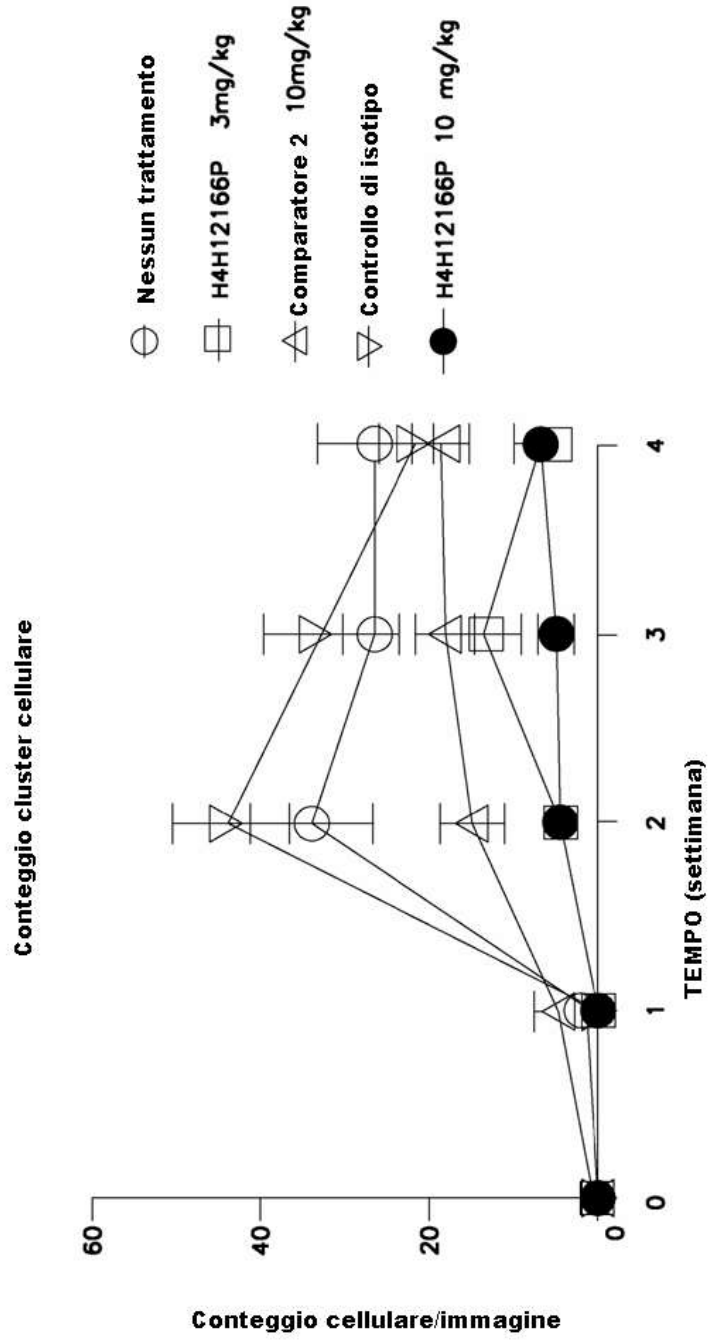


FIG. 13

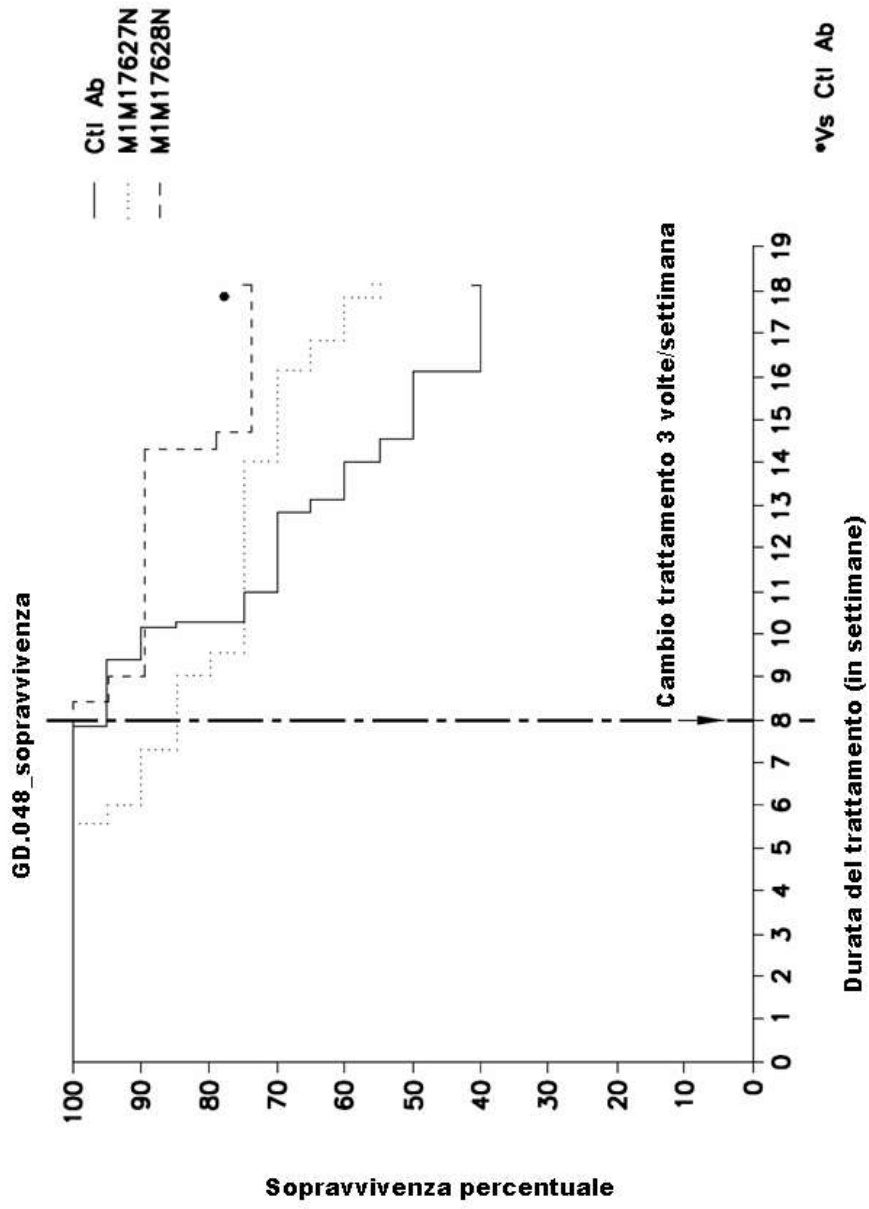
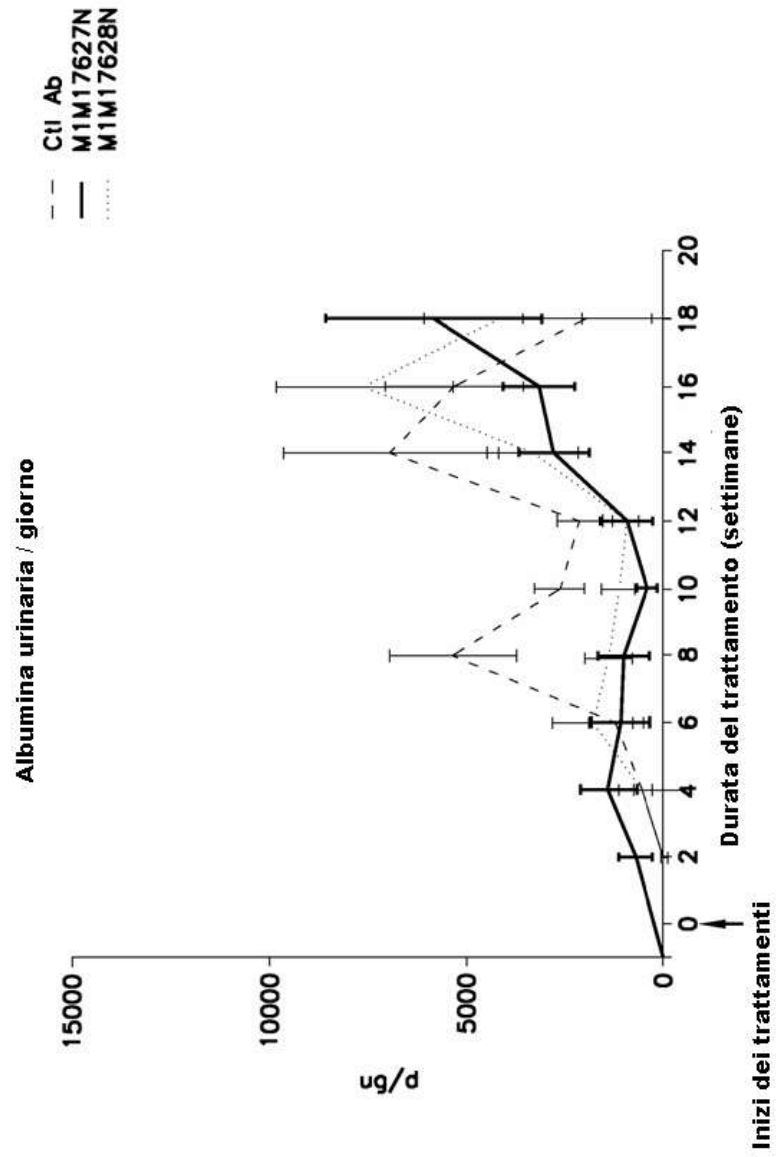
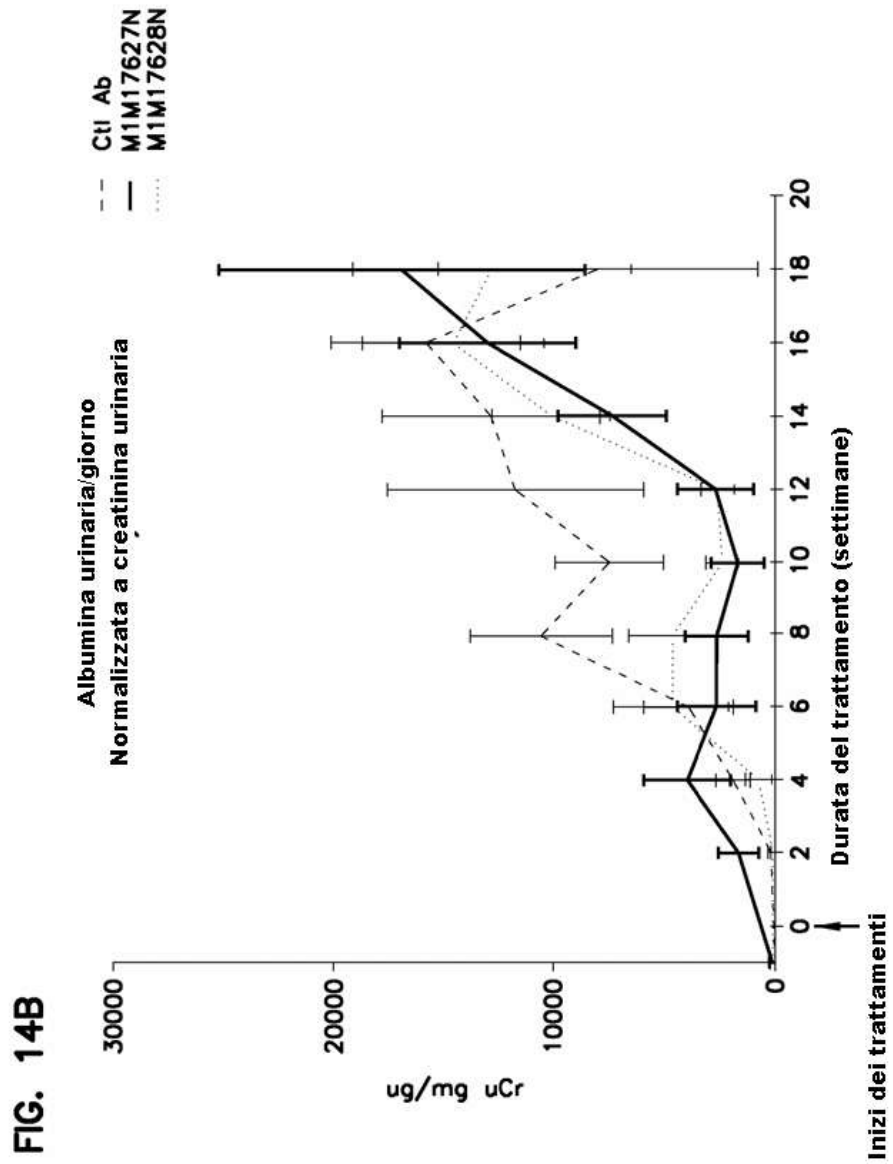


FIG. 14A





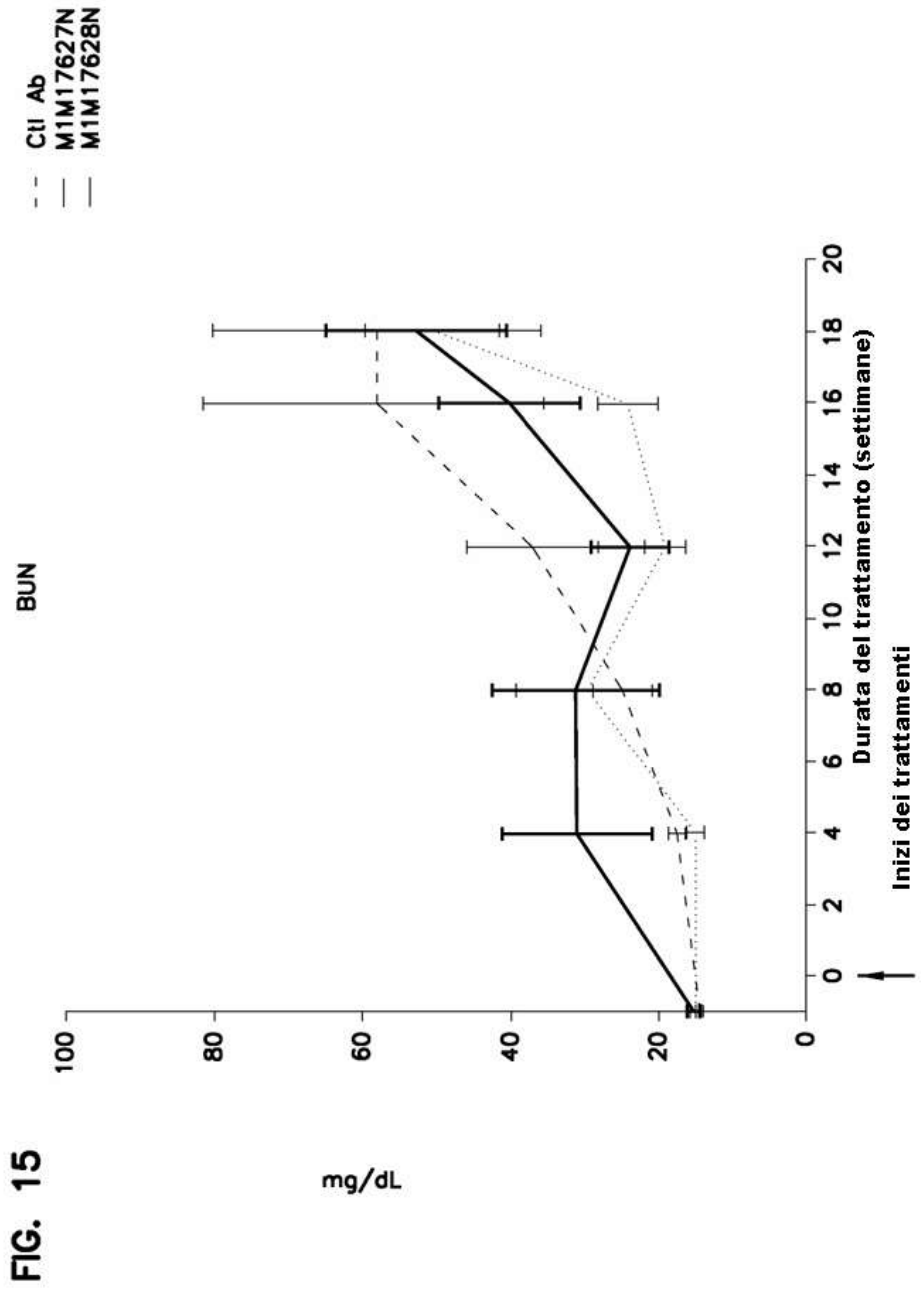


FIG. 16

