

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090129 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.08.31(51) Int. Cl. G01N 33/68 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2014.08.06(54) БЕЛКОВЫЕ БИОМАРКЕРЫ АТИПИЧНОГО ГЕМОЛИТИЧЕСКОГО
УРЕМИЧЕСКОГО СИНДРОМА

(31) 61/863,299; 61/913,180

(32) 2013.08.07; 2013.12.06

(33) US

(62) 201690346; 2014.08.06

(71) Заявитель:
АЛЕКСИОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)(72) Изобретатель:
Макнайт Сьюзан Фаас, Кофилл
Роксанне, Кукреджа Анджли, Бедард
Кристин А., Ян Ян (US)(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении предлагаются белковые биомаркеры, изменение концентрации или уровня активности которых связано с атипичным гемолитическим уремическим синдромом (aHUS), или с клинически значимым лечением aHUS с помощью ингибитора комплемента. Предлагаются также композиции и способы исследования концентрации и/или активности одного или более белковых биомаркеров в биологической жидкости. Композиции и способы пригодны среди прочего для оценки риска развития aHUS, диагностики aHUS, определения того, испытывает ли индивидуум первое острое проявление aHUS, мониторинга прогрессии или ослабления aHUS и/или мониторинга реакции на лечение ингибитором комплемента или оптимизации такого лечения.

202090129

A1

A1

202090129

БЕЛКОВЫЕ БИОМАРКЕРЫ АТИПИЧНОГО ГЕМОЛИТИЧЕСКОГО УРЕМИЧЕСКОГО СИНДРОМА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

В этой заявке испрашивается приоритет предварительных заявок США Nos. 61/913180 и 61/863299, поданных 6 декабря 2013 г. и 7 августа 2013 г., соответственно. Полное содержание вышеупомянутых заявок и любых патентов, патентных заявок и ссылок, цитируемых в данном описании, включено в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Изобретение относится к области медицины, иммунологии, молекулярной биологии и химии белков.

ИЗВЕСТНЫЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Гемолитический уремический синдром (HUS) характеризуется тромбоцитопенией, микроангиопатической гемолитической анемией и острой почечной недостаточностью. HUS классифицируется как один из двух типов: ассоциированный с диареей (D+HUS; также обозначаемый как HUS, вызванный *E. coli*, продуцирующей шига-токсин (STEC), или типичный HUS) и несвязанный с диареей или атипичный HUS (aHUS). D+HUS является самой распространенной формой, насчитывающей более 90% случаев, и обусловлен предшествующим заболеванием с наличием бактерий, продуцирующих шига-токсин, например, *E. coli* O157:H7. aHUS представляет собой редкое заболевание с показателем смертности до 25%. У многих больных этим заболеванием поддерживается постоянная неврологическая или почечная недостаточность, например, по меньшей мере, у 50% больных aHUS болезнь прогрессирует до терминальной стадии почечной недостаточности (ESRF). Смотри, например, Kavanagh et al. (2006) British Medical Bulletin 77 and 78:5-22.

aHUS может быть генетическим, приобретенным или идиопатическим. Наследуемые формы aHUS могут быть связаны с мутациями в ряде компонентов комплемента человека, включая, например, фактор Н комплемента (CFH), мембранный кофакторный белок (MCP), фактор I комплемента (CFI), C4b-связывающий белок

(C4BP), фактор В комплемента (CFB) и компонент 3 комплемента (C3). Смотри, например, Caprioli et al. (2006) Blood 108:1267-1279. Некоторые мутации в гене, кодирующем CD55, хотя и не участвуют в aHUS, связаны с тяжестью aHUS. Смотри, например, Esparza-Gordillo et al. (2005) Hum Mol Genet 14:703-712.

До недавнего времени варианты лечения больных aHUS были ограничены и часто включали инфузию плазмы или замещение плазмы. В некоторых случаях у больных aHUS проводили одно- или двустороннюю нефрэктомия или трансплантацию почки (смотри Artz et al. (2003) Transplantation 76:821-826). Однако рецидив заболевания у подвергавшихся лечению больных является распространенным явлением. Недавно лечение больных aHUS препаратом Soliris® было утверждено в Соединенных Штатах Америки и в Европе. Несмотря на наличие в конечном итоге пригодного лекарства для лечения больных aHUS, по-прежнему существует необходимость в диагностике больных aHUS, а также в прослеживании прогрессирования и ослабления aHUS.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении среди прочего предлагаются различные белки, чья активность и/или концентрация в биологической жидкости является аномальной у больных, страдающих aHUS и/или у тех больных aHUS, которые получают дополнительную терапию ингибиторами. Далее эти белки обозначаются как «белковые биомаркеры, связанные с aHUS» или «белковые биомаркеры aHUS». Например, авторы настоящего изобретения обнаружили, что концентрации и/или активность нескольких белков в крови (например, в сыворотке и/или плазме) и в моче являются аномальными у больных aHUS. Изобретатели также обнаружили, что после введения антагонистического антитела против C5 экулизумаба человеку, концентрации подгруппы этих белков изменяются. В некоторых случаях концентрация одного или более белков нормализуется. В то время как изобретение не ограничивается какой-либо конкретной теорией или механизмом действия, авторы изобретения полагают, что мониторинг больного, получавшего лечение ингибитором комплемента (например, антителом против C5), с целью изменения концентрации одного или

более из этих белков - белковых биомаркеров aHUS - пригоден, например, для диагностики больного, страдающего aHUS или имеющего риск развития aHUS. Мониторинг состояния одного или более из этих белковых биомаркеров также может быть пригоден для определения того, реагирует ли больной aHUS на терапию ингибитором комплемента. Кроме того, оценка состояния одного или более биомаркеров также пригодна для идентификации дозы - пороговой дозы - ингибитора комплемента, такого как антитело против C5, что в силу его влияния на концентрацию одного или более белковых биомаркеров aHUS у человека является достаточным для достижения клинически значимого эффекта при заболевании (т.е. достаточным для лечения заболевания, связанного с комплементом, такого как aHUS).

Соответственно, в одном аспекте изобретение относится к способу мониторинга или оценки статуса белковых биомаркеров, связанных с атипичным гемолитическим уремическим синдромом (aHUS) у индивидуума (например, млекопитающего, такого как человек), или к способу оценки одного или обоих концентрации и уровня активности, по меньшей мере, одного белкового биомаркера, связанного с атипичным гемолитическим уремическим синдромом (aHUS) у индивидуума. Способ включает измерение в биологической жидкости, полученной от индивидуума, одного или обоих из (i) концентрации, по меньшей мере, одного (например, по меньшей мере, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20) белковых биомаркеров, связанных с aHUS, в биологической жидкости, где белковые биомаркеры, связанные с aHUS, представляют собой любые из биомаркеров, представленных в таблице 1, например, биомаркер, выбранный из группы, состоящей из: протеолитического фрагмента компонента фактора В комплемента (например, Ba или Bb), растворимого C5b9 (sC5b9), тромбомодулина, VCAM-1, фактора фон Виллебранда (vWF), растворимого лиганда CD40 (sCD40L), фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , ICAM-1, IL-1 бета, IL-12 p70, компонента комплемента C5a, микроглобулина $\beta 2$ ($\beta 2M$),

кластерина, цистатина С, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, фактора роста клеток сосудистого эндотелия (VEGF), IL-6, альбумина, IL-8 и CCL5. Индивидуум может представлять собой, например, человека, страдающего aHUS, предположительно страдающего aHUS или имеющего риск его развития. Индивидуум может представлять собой человека, которого лечили (или в настоящее время лечат) ингибитором комплемента (например, ингибитором компонента C5 комплемента, таким как антитело против C5). Лечение может осуществляться менее одного месяца (например, менее 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 дня) до получения образца от индивидуума. Способ может дополнительно включать стадию определения того, страдает ли индивидуум aHUS или подвержен риску его развития. Если индивидуума лечили или лечат ингибитором комплемента (например, антителом против C5) по заранее определенной схеме дозирования, способ может дополнительно включать определение того, реагирует ли больной (терапевтически) на лечение ингибитором комплемента.

В другом аспекте изобретение относится к способу мониторинга или оценки статуса белковых биомаркеров, связанных с атипичным гемолитическим уремическим синдромом (aHUS) у индивидуума (например, млекопитающего, такого как человек), или к способу оценки одного или обоих концентрации и уровня активности, по меньшей мере, одного белкового биомаркера, связанного с атипичным гемолитическим уремическим синдромом (aHUS) у индивидуума. Способ включает: (А) измерение в биологической жидкости, полученной от индивидуума, концентрации, по меньшей мере, одного (например, по меньшей мере, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20) белковых биомаркеров, связанных с aHUS, в биологической жидкости, где белковые биомаркеры, связанные с aHUS, представляют собой любые из биомаркеров, представленных в таблице 1, например, биомаркер, выбранный из группы, состоящей из: протеолитического фрагмента компонента фактора В комплемента (например, Ва или

Bb), растворимого C5b9 (sC5b9), тромбомодулина, VCAM-1, фактора фон Виллебранда (vWF), растворимого лиганда CD40 (sCD40L), фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , ICAM-1, IL-1-бета, IL-12 p70, компонента комплемента C5a, микроглобулина $\beta 2$ ($\beta 2M$), кластерина, цистатина C, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, фактора роста клеток сосудистого эндотелия (VEGF), IL-6, альбумина, IL-8 и CCL5; и (B) записи (например, в электронном документе больного) результатов измерения(ий) или передачи результатов измерения(ий) индивидууму, опекуну индивидуума, или медицинскому работнику в чьем попечении находится индивидуум. Индивидуум может представлять собой, например, человека, страдающего aHUS, предположительно страдающего aHUS или имеющего риск его развития. Индивидуум может представлять собой человека, которого лечили (или в настоящее время лечат) ингибитором комплемента (например, ингибитором компонента C5 комплемента, таким как антитело против C5). Лечение может осуществляться менее одного месяца (например, менее 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 дня) до получения образца от индивидуума. Способ может дополнительно включать стадию определения того, страдает ли индивидуум aHUS или подвержен риску его развития. Если индивидуума лечили или лечат ингибитором комплемента (например, антителом против C5) по заранее определенной схеме дозирования, способ может дополнительно включать определение того, реагирует ли больной (терапевтически) на лечение ингибитором комплемента.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу мониторинга или определения того, подвержен ли больной риску развития тромботической микроангиопатии. Способ включает: (A) измерение в биологической жидкости, полученной от индивидуума, концентрации, по меньшей мере, одного (например, по меньшей мере, двух, трех, четырех) белкового биомаркера, связанного с тромбозом или свертыванием, в биологической жидкости, где белковые биомаркеры представляют собой любые из биомаркеров,

представленных в таблице 1 или таблице 11, например, F1+2 или D-димер; и (В) записи (например, в электронном документе больного) результатов измерения(ий) или передачи результатов измерения(ий) индивидууму, опекуну индивидуума или медицинскому работнику в чьем попечении находится индивидуум. Индивидуум может представлять собой, например, человека, страдающего aHUS, предположительно страдающего aHUS или имеющего риск его развития. Индивидуум может представлять собой человека, которого лечили (или в настоящее время лечат) ингибитором комплемента (например, ингибитором компонента C5 комплемента, таким как антитело против C5). Лечение может осуществляться менее одного месяца (например, менее 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 дня) до получения образца от индивидуума. Способ может дополнительно включать стадию определения того, страдает ли индивидуум aHUS или подвержен риску его развития (или имеет подтвержденный диагноз aHUS), с использованием способов, описанных в настоящем документе. Если индивидуума лечили или лечат ингибитором комплемента (например, антителом против C5) по заранее определенной схеме дозирования, способ может дополнительно включать определение того, реагирует ли больной (терапевтически) на лечение ингибитором комплемента, т.е. возникает ли снижение концентрации одного или более биомаркеров, связанных с тромбозом или свертыванием, после лечения ингибитором комплемента.

В другом аспекте изобретение относится к способу мониторинга или оценки статуса белковых биомаркеров, связанных с атипичным гемолитическим уремическим синдромом (aHUS), у индивидуума (например, млекопитающего, такого как человек), или к способу оценки одного или обоих концентрации и уровня активности, по меньшей мере, одного белкового биомаркера, связанного с атипичным гемолитическим уремическим синдромом (aHUS) у индивидуума. Способ включает: (А) измерение в биологической жидкости, полученной от индивидуума, концентрации, по меньшей мере, одного (например, по меньшей мере, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти,

10, 11, 12 или 13) белковых биомаркеров, связанных с aHUS, в биологической жидкости, где белковые биомаркеры, связанные с aHUS, представляют собой любые из биомаркеров, представленных в таблице 1, например, биомаркер, выбранный из группы, состоящей из: протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), C5a, тромбомодулина, VCAM-1, фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, sTNFR1, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина С, TIMP-1, и белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1); и (В) записи (например, в электронном документе больного) результатов измерения(ий) или передачи результатов измерения(ий) индивидууму, опекуну индивидуума или медицинскому работнику, в чьем попечении находится индивидуум. Индивидуум может представлять собой, например, человека, страдающего aHUS, предположительно страдающего aHUS или подверженного риску его развития. Индивидуум может представлять собой человека, которого лечили (или в настоящее время лечат) ингибитором комплемента (например, ингибитором компонента C5 комплемента, таким как антитело против C5). Лечение может осуществляться менее одного месяца (например, менее 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 дня) до получения образца от индивидуума. Способ может дополнительно включать стадию определения того, страдает ли индивидуум aHUS или подвержен риску его развития. Если индивидуума лечили или лечат ингибитором комплемента (например, антителом против C5) по заранее определенной схеме дозирования, способ может дополнительно включать определение того, реагирует ли больной (терапевтически) на лечение ингибитором комплемента.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в настоящем документе способов может дополнительно включать определение того, страдает ли индивидуум aHUS или подвержен риску его развития. В некоторых вариантах осуществления повышенная концентрация по сравнению с концентрацией в нормальной контрольной биологической жидкости того же типа, по

меньшей мере, одного из Ва, sC5b-9, C5a, sCD40L, фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, тромбомодулина, VCAM-1, vWF, FABP-1, β 2M, кластерины, цистатина С, TIMP-1, альбумина, NGAL, CXCL10, CXCL9, IL-18, TNFR1, VCAM-1, MCP-1, VEGF, CCL5, IL-6, IFN γ , указывает на то, что индивидуум страдает aHUS или подвержен риску его развития.

В некоторых вариантах осуществления любой из способов, описанных в настоящем документе, включает определение того, реагирует ли индивидуум на лечение ингибитором компонента. В некоторых вариантах осуществления (а) снижение концентрации по сравнению с концентрацией в образце биологической жидкости того же типа, полученном от индивидуума до начала лечения ингибитором, по меньшей мере, одного из CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, тромбомодулина, VCAM-1, фактора фон Виллебранда (vWF), компонента C5a комплемента, sC5b9, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерины, цистатина С, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), альбумина, CXCL10, CXCL9 и KIM-1; или (b) повышение концентрации CCL5 по сравнению с концентрацией в образце биологической жидкости того же типа, полученном от индивидуума до начала лечения ингибитором, указывает на то, что индивидуум реагирует на лечение ингибитором.

В другом аспекте изобретение относится к способу мониторинга реакции индивидуума (например, млекопитающего, такого как человек) на лечение ингибитором компонента C5 комплемента. Способ включает: измерение концентрации, по меньшей мере, двух белковых биомаркеров, связанных с aHUS, в биологической жидкости, где белковые биомаркеры, связанные с aHUS, представляют собой любой из биомаркеров, указанных в таблице 1, например, биомаркер, выбранный из группы, состоящей из: протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), тромбомодулина, VCAM-1, фактора фон Виллебранда (vWF),

растворимого лиганда CD40 (sCD40L), фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , ICAM-1, IL-1-бета, IL-12 p70, компонента C5a комплемента, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина C, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, фактора роста клеток сосудистого эндотелия (VEGF), IL-6, альбумина, IL-8 и CCL5. Биологическую жидкость получают от индивидуума: (i) страдающего aHUS, предположительно страдающего aHUS или подверженного риску его развития, и (ii) которого лечили (или, например, в настоящее время лечат) ингибитором компонента C5 комплемента по заранее определенной схеме дозирования. В соответствии с такими способами (a) снижение концентрации по сравнению с концентрацией в образце биологической жидкости того же типа, полученном от индивидуума до начала лечения ингибитором, по меньшей мере, одного из CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), фрагмента F1+2 протромбина, d-димера, тромбомодулина, VCAM-1, фактора фон Виллебранда (vWF), компонента C5a комплемента, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина C, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), альбумина, CXCL10, CXCL9 и KIM-1; или (b) повышение концентрации CCL5 по сравнению с концентрацией в образце биологической жидкости того же типа, полученном от индивидуума до начала лечения ингибитором, указывает на то, что индивидуум реагирует на лечение ингибитором.

В некоторых вариантах осуществления любой из способов, описанных в настоящем документе, включает определение того, будет ли индивидуум реагировать на лечение ингибитором комплемента. В некоторых вариантах осуществления наблюдается пониженная концентрация по сравнению с концентрацией в образце биологической жидкости того же типа, полученном от индивидуума до начала лечения ингибитором, по меньшей мере, одного из протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента

(например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), C5a, тромбомодулина, VCAM-1, фрагмента протромбина F1+2, D-димера, sTNFR1, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина С, TIMP-1 и белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1).

В другом аспекте изобретение относится к способу мониторинга реакции индивидуума на лечение ингибитором комплемента, где способ включает: определение концентрации, по меньшей мере, двух белковых биомаркеров, связанных с aHUS, в биологической жидкости, полученной от индивидуума, где белковые биомаркеры, связанные с aHUS, выбраны из группы, состоящей из: CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN-гамма, IL-6, протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), фрагмента протромбина F1+2, D-димера, тромбомодулина, VCAM-1, фактор фон Виллебранда (vWF), компонента C5a комплемента, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина С, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), альбумина, CXCL9, KIM-1 и CCL5. Индивидуум страдает aHUS или находится в состоянии риска его развития, и индивидуума лечили или лечат ингибитором комплемента. (А) Снижение концентрации по сравнению с концентрацией в образце биологической жидкости того же типа, полученном от индивидуума до начала лечения ингибитором, по меньшей мере, одного из CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , IL-6, протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), фрагмента F1+2 протромбина, d-димера, тромбомодулина, VCAM-1, фактора фон Виллебранда (vWF), компонента C5a комплемента, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина С, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), альбумина, CXCL9 и KIM-1; или (В) повышение концентрации CCL5 по сравнению с концентрацией в образце биологической жидкости того же типа, полученном от индивидуума до начала лечения ингибитором, указывает на то, что индивидуум реагирует на лечение ингибитором.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу

снижения числа, частоты или возникновения, вероятности возникновения, или риска развития ТМА с помощью ингибитора комплемента таким образом, который является достаточным для индукции физиологического изменения, по меньшей мере, двух белковых биомаркеров, связанных с тромбозом или свертыванием. Способ включает: (a) определение концентрации, по меньшей мере, двух белковых биомаркеров в биологической жидкости, полученной от индивидуума, где белковые биомаркеры выбраны из таблицы 1 или 11, и относятся к тромбозу и/или свертыванию (например, D-димер или F1+2) и (b) введение индивидууму, страдающему ТМА, предположительно страдающему ТМА или находящемуся в состоянии риска его развития, ингибитора комплемента в количестве и с частотой, достаточными для индукции физиологического изменения, по меньшей мере, каждого из двух (2) белковых биомаркеров, где физиологическое изменение представляет собой снижение концентрации, по меньшей мере, двух белковых биомаркеров по отношению к концентрации маркеров в эквивалентном биологическом образце, полученном от индивидуума до начала лечения ингибитором комплемента. Способ может включать измерение концентрации биомаркеров как до, так и после лечения.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу определения того, нуждается ли больной aHUS, которого лечили ингибитором комплемента по предварительно определенной схеме дозирования, в: (i) лечении другим ингибитором комплемента или (ii) лечении тем же ингибитором комплемента при другой схеме дозирования. Способ включает: (A) определение того, реагирует ли больной aHUS на лечение ингибитором комплемента по предварительно определенной схеме дозирования, где определение включает: измерение в биологической жидкости, полученной от индивидуума, одной или обеих концентрации и активности, по меньшей мере, двух белковых биомаркеров, связанных с aHUS, в биологической жидкости, где белковые биомаркеры, связанные с aHUS, выбраны из группы, состоящей из: протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), тромбомодулина, VCAM-1, фактора фон Виллебранда (vWF), растворимого лиганда CD40 (sCD40L),

фрагмента протромбина F1+2, D-димера, CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , ICAM-1, IL-1-бета, IL-12 p70, компонента C5a комплемента, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина C, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, фактора роста клеток эндотелия сосудов (VEGF), IL-6, альбумина, IL-8 и CCL5, и где: (a) снижение концентрации по сравнению с концентрацией в образце биологической жидкости того же типа, полученном от индивидуума до начала лечения ингибитором, по меньшей мере, одного из CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ba или Bb), растворимого C5b9 (sC5b9), фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, тромбомодулина, VCAM-1, фактора фон Виллебранда (vWF), компонента C5a комплемента, sC5b9, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина C, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), альбумина, CXCL10, CXCL9 и KIM-1; или (b) повышение концентрации CCL5 по сравнению с концентрацией в образце биологической жидкости того же типа, полученном от индивидуума до начала лечения ингибитором, указывает на то, что индивидуум реагирует на лечение ингибитором; и (B) если больной не отвечает на лечение ингибитором комплемента, введение больному другого ингибитора комплемента или того же ингибитора комплемента в более высокой дозе или с более частым режимом дозирования по сравнению с предварительно определенной схемой дозирования.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу определения того, нуждается ли больной aHUS, которого лечат ингибитором комплемента с предварительно заданным режимом дозирования, в: (i) лечении другим ингибитором комплемента или (ii) лечении тем же ингибитором комплемента по другой схеме дозирования. Способ включает: (A) определение того, реагирует ли больной aHUS на лечение ингибитором комплемента при предварительно заданной схеме дозирования, где определение включает: измерение в биологической жидкости, полученной от индивидуума, одной или обеих концентрации и активности, по

меньшей мере, двух белковых биомаркеров, связанных с aHUS, в биологической жидкости, где белковые биомаркеры, связанные с aHUS, выбраны из группы, состоящей из: протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), C5a, тромбомодулина, VCAM-1, фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, sTNFR1, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина С, TIMP-1, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), и где: (а) снижение концентрации по сравнению с концентрацией в образце биологической жидкости того же типа, полученном от индивидуума до начала лечения ингибитором, по меньшей мере, одного из протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), C5a, тромбомодулина, VCAM-1, фрагмент F1+2 протромбина, D-димера, sTNFR1, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина С, TIMP-1 и белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), указывает на то, что индивидуум реагирует на лечение ингибитором; и (В) если больной не отвечает на лечение ингибитором комплемента, введение больному другого ингибитора комплемента или того же ингибитора комплемента в более высокой дозе или с более частым режимом дозирования по сравнению с предварительно заданной схемой дозирования.

Концентрация одного или более белков может быть измерена с помощью, например, иммуноанализа (например, твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), радиоиммуноанализа (RIA), вестерн-блоттинга, или дот-блоттинга) или цитометрии на матрице с шариками (СВА, смотри рабочие примеры). Такие методы, а также наборы, пригодные для осуществления этих методов, описаны в настоящем документе. Подходящие способы измерения активности vWF известны в данной области техники и описаны в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряются концентрации, по меньшей мере, пяти отдельных белковых биомаркеров, связанных с aHUS. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в

настоящем документе способов измеряются концентрации, по меньшей мере, десяти отдельных белковых биомаркеров, связанных с aHUS. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряются концентрации, по меньшей мере, 15 отдельных белковых биомаркеров, связанных с aHUS. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряются концентрации, по меньшей мере, 20 отдельных белковых биомаркеров, связанных с aHUS.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, биологическая жидкость представляет собой кровь. В некоторых вариантах осуществления биологическая жидкость представляет собой фракцию крови, например, сыворотку или плазму. В некоторых вариантах осуществления биологическая жидкость представляет собой мочу. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов все измерения выполняются в одной биологической жидкости. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измерения выполняются, по меньшей мере, в двух различных биологических жидкостях, полученных от индивидуума. В некоторых вариантах осуществления измеряются концентрации, по меньшей мере, двух отдельных белковых биомаркеров, связанных с aHUS, и концентрацию первого белкового биомаркера, связанного с aHUS, определяют в одном типе биологической жидкости, а второй белковый биомаркер, связанный с aHUS, измеряют во втором типе биологической жидкости.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, измеряют концентрации, по меньшей мере, двух (например, по меньшей мере, трех, четырех или всех) из IFN- γ , ICAM-1, IL-1-бета и IL-12 p70. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряют концентрации обоих Ba и sC5b9. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряют концентрации одного или обоих C5a и

C5b9. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, измеряют концентрации, по меньшей мере, двух (например, по меньшей мере, трех, четырех, пяти, шести или всех) из $\beta 2M$, кластерина, цистатина С, NAG, TIMP-1, NGAL и FABP-1. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряют концентрации CXCL10, CXCL9 и/или KIM-1. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряют концентрации одного или обоих из D-димера и F1+2. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряют концентрации, по меньшей мере, двух (например, по меньшей мере, трех, четырех или всех) из sCD40L, фрагмента F1+2 протромбина и D-димера. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряют концентрации тромбомодулина, VCAM-1 и/или vWF. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряют концентрации CXCL10, MCP-1 и/или TNFR1. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, измеряют концентрации, по меньшей мере, двух (например, по меньшей мере, трех, четырех или всех) из IFN- γ , ICAM-1, IL-1-бета и IL-12 p70.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, концентрации одного или более из CXCL9, CXCL10, IL-1-бета, IL-12 p70, IFN- γ , MCP-1, CCL5, sCD40L и/или sTNFR1 измеряют в сыворотке индивидуума. В некоторых вариантах осуществления концентрации одного или более из компонента C5a комплемента, sC5b9, $\beta 2$ -микроглобулина ($\beta 2M$), кластерина, цистатина С, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), CXCL10, CXCL9 и/или KIM-1 измеряют в моче индивидуума. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрации одного или более из NGAL, протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Va или Vb), растворимого C5b9 (sC5b9), фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, тромбомодулина и/или фактора фон

Виллебранда (vWF) измеряют в плазме крови индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления измеряют концентрацию двух или более (например, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, 10, 11, 12 или 13) из протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ba или Bb), растворимого C5b9 (sC5b9), C5a, тромбомодулина, VCAM-1, фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, sTNFR1, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина С, TIMP-1, и белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1).

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряют концентрацию, по меньшей мере, двух из группы, состоящей из Ba, sC5b-9 и C5a. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряют концентрацию одного или обоих Ba и sC5b9. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряют концентрацию одного или обоих C5a и C5b9. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряют концентрации, по меньшей мере, двух отдельных членов группы, состоящей из β 2M, кластерина, цистатина С, альбумина, TIMP-1, NGAL и FABP-1. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряют концентрации, по меньшей мере, двух отдельных членов группы, состоящей из CXCL10, CXCL9, IL-18, MCP-1, TNFR1, VEGF, IL-6 и IFN γ . В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряют концентрации одного или обоих из d-димера и F1+2. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряют концентрации, по меньшей мере, двух отдельных членов группы, состоящей из sCD40L, фрагмента F1+2 протромбина и D-димера. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряют концентрации тромбомодулина, VCAM-1 или vWF. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряют концентрацию TNFR1. В некоторых

вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, измеряют концентрации, по меньшей мере, двух отдельных членов группы, состоящей из IFN- γ , CXCL10, CXCL9, IL-18, TNFR1, VCAM-1, MCP-1, VEGF, CCL5 и IL-6. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, измеряют концентрацию, по меньшей мере, одного белкового биомаркера, связанного с aHUS, выбранного из группы, состоящей из IFN- γ , CXCL10, CXCL9, IL-18, TNFR1, VCAM-1, MCP-1, VEGF и IL-6. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, измеряют концентрацию, по меньшей мере, одного белкового биомаркера, связанного с aHUS, выбранного из группы, состоящей из β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина C, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), CXCL10, CXCL9, альбумина и KIM-1. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, измеряют концентрацию, по меньшей мере, одного белкового биомаркера, связанного с aHUS, выбранного из группы, состоящей из: CXCL10, CXCL9, IL-18, MCP-1, TNFR1, VEGF, IL-6, CCL5, IFN γ , IL-8, ICAM-1, IL-1-бета и IL-12 p70. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, измеряют концентрации CXCL9, CXCL10, IL-1-бета, IL-12 p70, IFN- γ , MCP-1, CCL5, sCD40L или sTNFR1 в сыворотке индивидуума. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов, измеряют концентрацию, по меньшей мере, одного биомаркера, связанного с aHUS, выбранного из группы, состоящей из β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина C, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), CXCL10, CXCL9, альбумина и KIM-1 в моче индивидуума. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов, измеряют концентрацию NGAL, протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Va или Vb), растворимого C5b9 (sC5b9), фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, тромбомодулина или фактора фон Виллебранда (vWF) в плазме крови индивидуума. В некоторых

вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряют концентрацию Ва (например, в образце плазмы, полученной от индивидуума).

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов способ требует записи измеренного(ых) значения(ий) концентрации, по меньшей мере, одного белкового биомаркера aHUS. Запись может быть сделана в среде, читаемой на компьютере. Способ также может включать передачу измеренного(ых) значения(ий) концентрации, по меньшей мере, одного белкового биомаркера aHUS индивидууму и/или медицинскому работнику, в чьем попечении находится индивидуум.

В некоторых вариантах осуществления любой из способов, описанных в настоящем документе, может включать стадию введения индивидууму ингибитора комплемента в более высокой дозе или с повышенной частотой дозирования относительно предварительно определенной схемы дозирования, если индивидуум не реагирует на лечение ингибитором по предварительно заданной схеме дозирования.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов ингибитор комплемента вводят индивидууму в соответствии с предварительно заданной схемой дозирования на основе, в частности, массы тела индивидуума. Например, в случае антагонистического антитела против C5 (например, экулизумаба), для индивидуумов, имеющих массу тела больше или равную 40 кг, антитело можно вводить индивидууму в течение, по меньшей мере, 7 недель по следующей схеме: по меньшей мере, 800 мг антитела, один раз в неделю в течение четырех последовательных недель; по меньшей мере, 800 мг антитела один раз в течение пятой недели; и, по меньшей мере, 800 мг антитела каждые две недели после этого. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят индивидууму в течение, по меньшей мере, 7 недель по следующей схеме: по меньшей мере, 900 мг антитела один раз в неделю в течение четырех последовательных недель; по меньшей мере, 1200 мг антитела один раз в течение пятой недели; и, по меньшей мере, 1200 мг антитела каждые две недели после этого.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, в случае индивидуумов, имеющих массу тела менее 40 кг, но равную или более 30 кг, антитело можно вводить индивидууму в течение, по меньшей мере, 7 недель по следующей схеме: по меньшей мере, 500 мг антитела один раз в неделю в течение двух последовательных недель; по меньшей мере, 700 мг антитела один раз в течение третьей недели; и, по меньшей мере, 700 мг антитела каждые две недели после этого. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят индивидууму, по меньшей мере, в течение 5 недель по следующей схеме: по меньшей мере, 600 мг антитела один раз в неделю в течение двух последовательных недель; по меньшей мере, 900 мг антитела один раз в течение третьей недели; и, по меньшей мере, 900 мг антитела каждые две недели после этого.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, масса тела индивидуума составляет менее 30 кг, но более или равна 20 кг, и антитело вводят индивидууму в течение, по меньшей мере, 5 недель по следующей схеме: по меньшей мере, 500 мг антитела один раз в неделю в течение двух последовательных недель; по меньшей мере, 500 мг антитела один раз в течение третьей недели; и, по меньшей мере, 500 мг антитела каждые две недели после этого. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят индивидууму, по меньшей мере, 5 недель по следующей схеме: по меньшей мере, 600 мг антитела один раз в неделю в течение двух последовательных недель; по меньшей мере, 600 мг антитела один раз в течение третьей недели; и по меньшей мере, 600 мг антитела каждые две недели после этого.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, масса тела индивидуума составляет менее 20 кг, но более или равна 10 кг, и антитело вводят индивидууму в течение, по меньшей мере, 4 недель по следующей схеме: по меньшей мере, 500 мг антитела один раз в неделю в течение одной недели; по меньшей мере, 200 мг антитела один раз в течение второй недели; и, по меньшей мере, 200 мг антитела каждые две недели после этого. В некоторых вариантах

осуществления антитело вводят индивидууму в течение, по меньшей мере, 4 недель по следующей схеме: по меньшей мере, 600 мг антитела раз в неделю в течение одной недели; по меньшей мере, 300 мг антитела один раз в течение второй недели; и, по меньшей мере, 300 мг антитела каждые две недели после этого.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, масса тела индивидуума составляет менее 10 кг, но более или равна 5 кг, и антитело вводят индивидууму в течение, по меньшей мере, 5 недель по следующей схеме: по меньшей мере, 200 мг антитела, один раз в неделю в течение одной недели; по меньшей мере, 200 мг антитела один раз в течение второй недели; и, по меньшей мере, 200 мг антитела раз в три недели после этого. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят индивидууму, по меньшей мере, 5 недель по следующей схеме: по меньшей мере, 300 мг антитела один раз в неделю в течение одной недели; по меньшей мере, 300 мг антитела один раз в течение второй недели; и, по меньшей мере, 300 мг антитела каждые три недели после этого. Дополнительные примеры схем дозирования антител против C5 (например, схем хронического дозирования) для лечения aHUS описаны в публикации международной патентной заявки WO 2010/054403 (например, в таблицах 1 и 2 заявки WO 2010/054403), раскрытие которой включено в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов ингибитор представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, небольшую молекулу, полипептид, аналог полипептида, пептидомиметик или аптамер. В некоторых вариантах осуществления ингибитор может представлять собой ингибитор, который ингибирует один или более из компонентов комплемента C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, фактор D, фактор В, пропердин, MBL, MASP-1, MASP-2, или биологически активные фрагменты любого из перечисленного выше. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов ингибитор комплемента ингибирует одно или оба события – возникновение анафилактической

активности, связанной с C5a, и/или сборку мембраноатакующего комплекса, связанную с C5b.

Композиции могут также содержать природные или растворимые формы соединений, ингибирующих комплемент, таких как CR1, LEX-CR1, MCP, DAF, CD59, фактор Н, фактор яда кобры, FUT-175, комплестатин и K76 COOH.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор комплемента может представлять собой молекулу фактора Н (FH) рецептора 2 комплемента (CR2), включающую: а) часть CR2, включающую CR2 (например, CR2 человека) или его фрагмент, и b) часть FH, включающую FH или его фрагмент, где молекула CR2-FH или ее фрагмент способны связываться с лигандом CR2, и где молекула CR2-FH способна ингибировать активацию альтернативного пути комплемента. Примеры гибридных белков CR2-FH описаны и проиллюстрированы, например, в международных публикациях патентных заявок Nos WO 2007/149567 и WO 2011/143637, содержание каждой из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления ингибитор комплемента включает направляющий домен, такой как CR2 или антитело против C3d, как описано, например, в международной публикации патентной заявки по. WO 2011/163412, раскрытие которой включено в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме. Гибриды направляющих доменов с другими ингибиторами комплемента, такими как CD59, CD55 и молекулы, подобные фактору Н, могут быть использованы в способах, описанных в настоящем документе, в качестве ингибитора комплемента. См. WO 2011/163412 выше.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов ингибитор комплемента представляет собой антагонистическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть выбрано из группы, состоящей из гуманизированного антитела, рекомбинантного антитела, диатела, химеризированного или химерного антитела, моноклонального антитела, деиммунизированного антитела, полностью человеческого антитела, одноцепочечного антитела, фрагмента Fv, фрагмента Fd, фрагмента

Fab, фрагмента Fab' и фрагмента F(ab')₂.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов антагонистическое антитело представляет собой антитело против C5, такое как экулизумаб. В некоторых вариантах осуществления антагонистическое антитело представляет собой пекселезумаб, C5-связывающий фрагмент антитела против C5.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов ингибитор комплемента выбран из группы, состоящей из MB12/22, MB12/22-RGD, ARC187, ARC1905, SSL7 и OmCI.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов подгруппа белковых биомаркеров, связанных с aHUS, из которой практикующий специалист может определить концентрацию одного или более (например, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, 10 или более) биомаркеров, может представлять собой: Ва, тромбомодулин, VCAM-1, TNFR1, F1+2, D-димер, CXCL10, IL-6, кластерин, TIMP-1, FABP-1, β 2M и цистатин С.

В еще одном аспекте в изобретении предлагается матрица, включающая множество связывающих агентов, где каждый связывающий агент из множества имеет уникальный адрес на матрице, где матрица включает не более 500 уникальных адресов, где каждый связывающий агент из множества связывается с отличным биологическим белковым анализируемым веществом, и где матрица включает связывающие агенты, которые связываются с четырьмя или более анализируемыми белковыми веществами, указанными в таблице 1, например, выбранными из группы, состоящей из: протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), тромбомодулина, VCAM-1, фактора фон Виллебранда (vWF), растворимого лиганда CD40 (sCD40L), фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , ICAM-1, IL-1-бета, IL-12 p70, компонента C5a комплемента, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина С, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1,

связывающего жирные кислоты (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, фактора роста клеток сосудистого эндотелия (VEGF), IL-6, альбумина, IL-8 и CCL5. Матрица пригодна для любого из описанных в настоящем документе способов. В некоторых вариантах осуществления матрица представляет собой белковый чип. В некоторых вариантах осуществления каждый адрес матрицы представляет собой лунку аналитического планшета. В некоторых вариантах осуществления каждый адрес матрицы представляет собой частицу (например, шарик), имеющую иммобилизованный на ней связывающий агент.

При использовании в настоящем документе термин «связывающий агент» включает любой природный, синтетический агент или агент, созданный методами генной инженерии, такой как белок, который связывается с антигеном (например, белковым биомаркером aHUS). Связывающие агенты могут представлять собой или происходить от природных антител. Связывающий белок или агент может функционировать сходно с антителом, связываясь со специфическим антигеном с образованием комплекса. Связывающие агенты или белки могут включать выделенные антигенсвязывающие фрагменты антител.

В некоторых вариантах осуществления матрица включает антитела, которые связываются, по меньшей мере, с двумя (например, по меньшей мере, с тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью, девятью, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25) анализируемыми белками. Например, матрица может включать связывающие агенты/антитела, которые связываются, по меньшей мере, с двумя (например, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью, девятью, 10, 11, 12 или 13) протеолитическим фрагментом фактора В компонента комплемента (например, Ba или Bb), растворимым C5b9 (sC5b9), C5a, тромбомодулином, VCAM-1, фрагментом F1+2 протромбина, D-димером, sTNFR1, β 2-микроглобулином (β 2M) кластерином, цистатином C, TIMP-1 и белком 1, связывающим жирные кислоты (FABP-1).

В некоторых вариантах осуществления матрица включает не

более 200 (например, не более 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25 или 20) уникальных адресов.

В еще одном аспекте в изобретении предлагается диагностический набор, включающий одну или более из любых матриц, описанных в настоящем документе, и необязательно инструкции по (а) получению и/или обработке биологического образца (например, в биологической жидкости) от индивидуума и/или (b) измерению одного или более анализируемых веществ в биологических образцах (например, в биологической жидкости) от индивидуума.

В другом аспекте в изобретении предлагается диагностический набор, включающий: (а) аналитический планшет и (b) по меньшей мере, три связывающих агента, причем каждый связывающий агент способен связываться с отличным биологическим анализируемым веществом, где анализируемые вещества представляют собой вещества, представленные в таблице 1, например, выбранные из группы, состоящей из: протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), тромбомодулина, VCAM-1, фактора фон Виллебранда (vWF), растворимого лиганда CD40 (sCD40L), фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , ICAM-1, IL-1-бета, IL-12 p70, компонента C5a комплемента, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина С, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, фактора роста клеток сосудистого эндотелия (VEGF), IL-6, альбумина, IL-8 и CCL5. В некоторых вариантах осуществления диагностический набор включает одно или более средств для измерения активности vWF в плазме крови человека.

В другом аспекте в изобретении предлагается способ диагностики индивидуума как страдающего атипичным гемолитическим уремическим синдромом (aHUS) или находящегося в состоянии риска его развития. Способ включает: измерение в биологической жидкости концентрации, по меньшей мере, двух белковых биомаркеров, связанных с aHUS, выбранных из группы,

состоящей из: протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), тромбомодулина, VCAM-1, фактора фон Виллебранда (vWF), растворимого лиганда CD40 (sCD40L), фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , ICAM-1, IL-1-бета, IL-12 p70, компонента C5a комплемента, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина С, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, фактора роста клеток сосудистого эндотелия (VEGF), IL-6, альбумина, IL-8 и CCL5. Биологическая жидкость представляет собой жидкость, полученную от индивидуума, у которого предполагается наличие aHUS или риск его развития. В соответствии с методами, повышенная концентрация по сравнению с концентрацией в нормальной контрольной биологической жидкости того же типа, по меньшей мере, одного из Ва, sC5b-9, C5a, sCD40L, фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, тромбомодулина, VCAM-1, vWF, FABP-1, β 2M, кластерина, цистатина С, TIMP-1, альбумина, NGAL, CXCL10, CXCL9, IL-18, TNFR1, VCAM-1, MCP-1, VEGF, CCL5, IL-6 или IFN γ указывает на то, что индивидуум страдает aHUS или находится в состоянии риска его развития. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, два связанных с aHUS биомаркера могут быть выбраны из таблицы 11, т.е., по меньшей мере, два (например, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, 10, 11, 12 или 13) из протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), C5a, тромбомодулина, VCAM-1, фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, sTNFR1, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина С, TIMP-1, и белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1).

При использовании в настоящем документе термин «нормальный» при использовании для модификации термина «индивидуальный» или «индивидуум» относится к индивидууму или группе индивидуумов, который(ые) не имеет(ют) конкретного заболевания или состояния (например, aHUS), а также не подозреваются на наличие или риск развития заболевания или

состояния. Термин «нормальный» также используется в данном документе, чтобы квалифицировать биологический образец или пробу (например, биологическую жидкость), выделенную от нормального или здорового человека или индивидуума (или группы таких индивидуумов), например, «нормальный контрольный образец» или «нормальная контрольная биологическая жидкость».

В еще одном аспекте изобретение относится к способу определения того, испытывает ли больной первую острую манифестацию атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS). Способ включает: измерение одной или обеих из концентрации D-димера (например, концентрации D-димера в плазме) и концентрации белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1) (например, концентрации FABP-1 в моче), где повышение концентрации D-димера по отношению к концентрации D-димера в нормальном контрольном образце и повышение концентрации FABP-1 по отношению к концентрации FABP-1 в нормальном контрольном образце указывает на то, что больной испытывает первую острую манифестацию aHUS. В некоторых вариантах осуществления повышение одного или обоих D-димера и FABP-1 может представлять собой существенное повышение.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS), причем способ включает введение индивидууму, страдающему aHUS, подозреваемому в его наличии или находящемуся в состоянии риска его развития, ингибитора комплемента (например, ингибитора компонента C5 комплемента) в количестве и с частотой, достаточной для индукции физиологического изменения, по меньшей мере, одного (например, по меньшей мере, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25) белковых биомаркеров aHUS, где физиологическим изменение выбрано из группы, состоящей из: (а) снижения концентрации по сравнению с концентрацией в образце биологической жидкости того же типа, полученном от индивидуума до начала лечения ингибитором, по меньшей мере, одного из CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ ,

протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), фрагмента F1+2 протромбина, d-димера, тромбомодулина, VCAM-1, фактора фон Виллебранда (vWF), компонента C5a комплемента, sC5b9, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерины, цистатина С, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), альбумина, CXCL10, CXCL9 и KIM-1; или (b) повышения концентрации CCL5 по сравнению с концентрацией в образце биологической жидкости того же типа, полученном от индивидуума до начала лечения ингибитором. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один связанный с aHUS биомаркер может быть выбран из таблицы 11, т.е., по меньшей мере, один (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, 10, 11, 12, или 13) из протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), C5a, тромбомодулина, VCAM-1, фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, sTNFR1, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерины, цистатина С, TIMP-1, и белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1).

В еще одном аспекте изобретение относится к способу лечения атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS) с помощью ингибитора комплемента методом, достаточным для индукции физиологического изменения, по меньшей мере, двух белковых биомаркеров, связанных с aHUS. Способ включает: (a) определение концентрации, по меньшей мере, двух белковых биомаркеров, связанных с aHUS, в биологической жидкости, полученной от индивидуума, где белковые биомаркеры, связанные с aHUS, выбраны из группы, состоящей из: CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , IL-6, протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, тромбомодулина, VCAM-1, фактора фон Виллебранда (vWF), компонента C5a комплемента, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерины, цистатина С, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1, связывающего жирные кислоты, (FABP-1), альбумина, CXCL9, KIM-1 и CCL5; и (b) введение индивидууму, страдающему aHUS, подозреваемому в его наличии или находящемуся

в состоянии риска его развития, ингибитора комплемента в количестве и с частотой, достаточными для индукции физиологического изменения, по меньшей мере, каждого из двух (2) белковых биомаркеров, связанных с aHUS, где физиологическое изменение выбирают из группы, состоящей из: (а) снижения концентрации по сравнению с концентрацией в образце биологической жидкости того же типа, полученном от индивидуума до начала лечения ингибитором, по меньшей мере, одного из CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , IL-6, протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, тромбомодулина, VCAM-1, фактора фон Виллебранда (vWF), компонента C5a комплемента, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина С, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), альбумина, CXCL9 или KIM-1; а также (b) повышения концентрации CCL5 в биологической жидкости, полученной от индивидуума, по сравнению с концентрацией в образце биологической жидкости того же типа, полученном от индивидуума до начала лечения ингибитором. Способ также может включать определение того, произошли ли физиологические изменения. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, два биомаркера, связанных с aHUS, могут быть выбраны из таблицы 11, т.е., по меньшей мере, два (например, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, 10, 11, 12 или 13) из протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), C5a, тромбомодулина, VCAM-1, фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, sTNFR1, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина С, TIMP-1 и белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1).

В некоторых вариантах осуществления способы могут дополнительно включать стадию измерения концентрации, по меньшей мере, двух отдельных белковых биомаркеров, связанных с aHUS, в биологической жидкости, где белковые биомаркеры, связанные с aHUS, выбраны из группы, состоящей из: протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента

(например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), тромбомодулина, VCAM-1, фактора фон Виллебранда (vWF), растворимого лиганда CD40 (sCD40L), фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , ICAM-1, IL-1-бета, IL-12 p70, компонента C5a комплемента, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина C, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, фактора роста клеток сосудистого эндотелия (VEGF), IL-6, альбумина, IL-8 и CCL5. Биологическую жидкость получают от индивидуума. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, два биомаркера, связанных с aHUS, могут быть выбраны из таблицы 11, т.е., по меньшей мере, два (например, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, 10, 11, 12 или 13) из протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), C5a, тромбомодулина, VCAM-1, фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, sTNFR1, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина C, TIMP-1 и белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1).

В некоторых вариантах осуществления любой из способов, описанных в настоящем документе, может включать определение того, возникают ли, по меньшей мере, два (например, по меньшей мере, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25) физиологических изменения. В некоторых вариантах осуществления концентрация, по меньшей мере, двух из IFN- γ , ICAM-1, IL-1-бета и IL-12 p70 снижается. В некоторых вариантах осуществления снижается концентрация как Ва, так и sC5b9. В некоторых вариантах осуществления концентрация (например, концентрация в моче) каждого из C5a и sC5b9 снижается. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, концентрации (например, концентрации в моче), по меньшей мере, двух (например, по меньшей мере, трех, четырех, пяти, шести или всех) из β 2M, кластерина, цистатина C, NAG, TIMP-1, NGAL и FABP-1 снижаются. В некоторых вариантах осуществления концентрации (например, концентрации в моче) CXCL10, CXCL9

и/или KIM-1 снижаются. В некоторых вариантах осуществления концентрации (например, концентрации в плазме) одного или обоих D-димера и F1+2 снижаются. В некоторых вариантах осуществления концентрации (например, концентрации в сыворотке и/или плазме), по меньшей мере, двух (например, по меньшей мере, трех или всех) из sCD40L, фрагмента F1+2 протромбина, и D-димера снижаются. В некоторых вариантах осуществления концентрации тромбомодулина, VCAM-1 и/или vWF снижаются. В некоторых вариантах осуществления концентрации (например, концентрации в сыворотке) CXCL10, MCP-1 и TNFR1 снижаются. В некоторых вариантах осуществления концентрации (например, концентрации в сыворотке), по меньшей мере, двух (например, по меньшей мере, трех, четырех или всех) из IFN- γ , ICAM-1, IL-1-бета и IL-12 p70 снижаются. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, два физиологических изменения могут представлять собой снижение концентрации, по меньшей мере, двух связанных с aHUS биомаркеров, выбранных из таблицы 11, т.е., по меньшей мере, двух (например, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, 10, 11, 12 или 13) из протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Va или Vb), растворимого C5b9 (sC5b9), C5a, тромбомодулина, VCAM-1, фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, sTNFR1, β 2-микроглобулина (β 2M) кластерина, цистатина С, TIMP-1, и белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1).

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрация Va (например, концентрация Va в плазме) снижается, по меньшей мере, на 10% через 6 недель после начала лечения. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрация Va (например, концентрация Va в плазме) снижается, по меньшей мере, на 30% через 12 недель после начала лечения. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрация C5a (например, концентрация C5a в моче) снижается, по меньшей мере, на 40% через 3 недели после начала лечения. В некоторых

вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрация C5a (например, концентрация C5a в моче) снижается, по меньшей мере, на 70% через 6 недель после начала лечения. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрация C5b-9 (например, концентрация C5b-9 в моче или плазме) снижается, по меньшей мере, на 50% через 3 недели после начала лечения. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, концентрация F1+2 (например, концентрация F1+2 в плазме) снижается, по меньшей мере, на 20% через 6 недель после начала лечения. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов, концентрация D-димера (например, концентрация D-димера в плазме) снижается, по меньшей мере, на 40% через 6 недель после начала лечения. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрация тромбомодулина (например, концентрация сывороточного тромбомодулина) снижается, по меньшей мере, на 20% через 12 недель после начала лечения. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрация VCAM-1 (например, концентрация VCAM-1 в сыворотке) снижается, по меньшей мере, на 20% через 12 недель после начала лечения.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов ингибитор комплемента вводят индивидууму в количестве и с частотой, достаточными для индукции физиологического изменения трех или более биомаркеров, связанных с aHUS. В некоторых вариантах осуществления ингибитор комплемента вводят индивидууму в количестве и с частотой, достаточными для индукции физиологического изменения, по меньшей мере, четырех связанных с aHUS биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления ингибитор комплемента вводят индивидууму в количестве и с частотой, достаточными для индукции физиологического изменения, по меньшей мере, пяти связанных с aHUS биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления ингибитор комплемента вводят индивидууму в

количестве и с частотой, достаточными для индукции физиологического изменения, по меньшей мере, 10 связанных с aHUS биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления ингибитор комплемента вводят индивидууму в количестве и с частотой, достаточными для индукции физиологического изменения, по меньшей мере, 15 или более связанных с aHUS биомаркеров.

В некоторых вариантах осуществления физиологический изменение, по меньшей мере, двух (например, по меньшей мере, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25, или более) биомаркеров, связанных с aHUS, происходит в течение двух дней, трех дней, четырех дней, пяти дней, шести дней, за неделю, две недели, три недели, четыре недели, шесть недель, два месяца, девять недель, или три месяца или более после введения (например, хронического введения) ингибитора.

В некоторых вариантах осуществления концентрация, по меньшей мере, одного (например, по меньшей мере, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25) связанных с aHUS белковых биомаркеров снижается, по меньшей мере, на 5 (например, по меньшей мере, на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 или 70)% после введения ингибитора.

В некоторых вариантах осуществления концентрация, по меньшей мере, одного (например, по меньшей мере, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25) связанных с aHUS белковых биомаркеров снижается в пределах 50 (например, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1)% от нормальной концентрации белковых биомаркеров после введения одной или более доз ингибитора.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, концентрация FАВР-1 (например, концентрация FАВР-1 в моче) снижается, по меньшей мере, на 80% (например, на 85, 90, 95 или до 100%) после введения ингибитора

комплемента человека (например, антитела против C5). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, концентрация цистатина-С (например, концентрация цистатина-С в моче) снижается, по меньшей мере, на 80% (например, на 85, 90, 95, 99, или до 100%) после введения ингибитора комплемента человека (например, антитела против C5). В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов, концентрация кластерина (например, концентрация кластерина в моче) снижается, по меньшей мере, на 80% (например, на 85, 90, 95, 98, или до 100%) после введения ингибитора комплемента человека (например, антитела против C5). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, концентрация протеолитического фрагмента фактора В (например, Ва) снижается, по меньшей мере, на 10% (например, на 15, 20, 25, 30 или 40%) после введения ингибитора комплемента человека (например, антитела против C5). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, концентрация sTNFR1 снижается, по меньшей мере, на 80% (например, на 85, 90 или более %) после введения ингибитора комплемента человека (например, антитела против C5). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, концентрация тромбомодулина или sVCAM-1 снижается, по меньшей мере, на 80% (например, на 85, 90, 95 или до 100%) после введения ингибитора комплемента человека (например, антитела против C5). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, концентрация одного или обоих F1+2 или D-димера снижается, по меньшей мере, на 80% (например, на 85, 90, 95 или более %) после введения ингибитора комплемента человека (например, антитела против C5).

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, концентрация, по меньшей мере, одного (например, по меньшей мере, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25) из белковых биомаркеров, связанных с aHUS, нормализуется после введения ингибитора. В

некоторых вариантах осуществления концентрации (например, концентрации в моче), по меньшей мере, трех из $\beta 2$ -микроглобулина ($\beta 2M$), кластерина, цистатина С, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), CXCL10, CXCL9, и KIM-1 нормализуются.

При использовании в настоящем документе термин «нормализованный» или подобные грамматические термины при использовании в контексте влияния лечения ингибитором комплемента на концентрацию или активность белкового биомаркера aHUS относится к концентрации или активности белкового биомаркера, измеренной в биологической жидкости, которая составляет 50 (например, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1)% от диапазона средней концентрации или активности белковых биомаркеров aHUS при измерении в образце того же типа биологической жидкости, полученной от группы здоровых лиц (нормальных индивидуумов). Например, лечение больного aHUS ингибитором комплемента может нормализовать повышенную концентрацию кластерина в моче в пределах, например, 20% нормального среднего диапазона концентрации кластерина в моче. В некоторых вариантах осуществления лечение ингибитором комплемента должно восстановить концентрацию кластерина в моче до пределов нормального диапазона средней концентрации кластерина в моче.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, индивидуум находился на диализе, по меньшей мере, один раз (например, по меньшей мере, дважды, трижды, четыре раза или пять раз или более) в пределах трех месяцев (например, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 недели(ль)) до начала лечения ингибитором. Например, в некоторых вариантах осуществления индивидуум находился на диализе один раз за два месяца до получения лечения ингибитором комплемента. В другом примере индивидуум может представлять собой индивидуума, который находится на диализе три раза в

течение периода в три месяца непосредственно перед получением лечения ингибитором комплемента. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрации одного или более из TNFR1, Ba, тромбомодулина, фрагмента F1+2 и sC5b9 повышены по отношению к концентрации у здорового индивидуума. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, концентрации одного или более из β 2M, sC5b9, C5a, цистатина C, кластерина, TIMP-1 и NGAL повышены по отношению к концентрации (например, концентрации в моче) у здорового человека.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов индивидуумом (например, человек) испытывает первую острую манифестацию aHUS. Например, до начала лечения ингибитором комплемента, индивидуум мог иметь повышенные концентрации одного или обоих из D-димера и FABP-1 по отношению к нормальным концентрациям.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, индивидуум (например, человек) представляет собой индивидуума, страдающего aHUS, но считающегося находящимся в стадии клинической ремиссии (например, индивидуум представляет собой индивидуума, имеющего нормальные уровни тромбоцитов или других гематологических маркеров, таких как LDH или гаптоглобин). В некоторых вариантах осуществления такой индивидуум представляет собой индивидуума, имеющего повышенные уровни одного или более из биомаркеров aHUS, описанных в настоящем документе, включая, но, не ограничиваясь этим, один или более из Ba, D-димера, VCAM-1 и фрагментов 1+2 протромбина.

Понятно, что в любом из способов, описанных в данном документе, может быть определена концентрация и/или активность одного или нескольких белковых биомаркеров aHUS. Например, в некоторых вариантах осуществления практикующий специалист может измерить активность vWF в биологическом образце, полученном от индивидуума, как замену концентрации vWF (или других белковых биомаркеров) в образце. Методы оценки относительной активности

белковых биомаркеров aHUS, представленных в таблице 1, известны в данной области техники.

Как подробно обсуждалось в настоящем документе (например, в рабочих примерах), aHUS является генетическим, угрожающим жизни заболеванием, вовлекающим хроническое нарушение регуляции комплемента. Больные, пораженные болезнью, страдают, среди прочего, от тромботической микроангиопатии (ТМА), которая может привести к инсульту и почечной недостаточности. Экулизумаб, антагонистическое антитело против C5, как показано, значительно снижает ТМА, нормализует уровень тромбоцитов, а также улучшает функцию почек у больных aHUS. Тем не менее, даже с четким и надежным клиническим преимуществом лечения ингибитором комплемента больных aHUS, некоторые больные все еще имеют повышенные уровни нескольких белковых биомаркеров aHUS на фоне лечения. Например, авторы настоящего изобретения обнаружили, что у некоторых больных уровни протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ba или Bb) (например, в плазме) не нормализуются после лечения антагонистическим антителом против C5. Кроме того, у некоторых больных уровни фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, тромбомодулина, VCAM-1, TNFR1 и CXCL10 снижаются, но не нормализуются с течением времени. Хотя изобретение не ограничивается какой-либо конкретной теорией или механизмом действия, эти наблюдения предполагают, что для некоторых больных низкие уровни воспаления и коагулопатия могут сохраняться даже при лечении ингибитором комплемента. Таким образом, раскрытие охватывает способы, при которых ингибитор комплемента вводят в сочетании со вторым видом терапии, направленным на низкий уровень персистирующего воспаления у некоторых больных aHUS.

Таким образом, в еще одном аспекте изобретение относится к способу лечения атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS). Способ включает введение (например, хроническое введение) индивидууму (например, человеку), страдающему aHUS, предположительно страдающему aHUS или находящегося в состоянии риска его развития, терапевтически

эффективного количества ингибитора комплемента (например, ингибитора компонента C5 комплемента) и терапевтически эффективного количества: (i) антикоагулянта, (ii) фибринолитического агента; (iii) противовоспалительного агента; или (iv) ингибитора IL-6, IL-8, CXCL-9, IL-18 или VEGF. В некоторых вариантах осуществления могут быть использованы два ингибитора комплемента (например, ингибитор C5 и ингибитор C3, такие как антитело против фактора В, антитело против C3 или антитело против C3b). В некоторых вариантах осуществления во время прекращения лечения ингибитором C5, больному может быть введен ингибитор компонента C3 комплемента в течение периода времени, достаточного для снижения вышележащего альтернативного пути активации.

В некоторых вариантах осуществления способы могут включать мониторинг состояния одного или более биомаркеров aHUS и определение того, следует ли начинать второй тип лечения (в дополнение к лечению ингибитором комплемента) или модифицировать режим дозирования одного или более агентов второго типа лечения, вводимых больному aHUS. Например, во время лечения (например, хронического лечения) ингибитором комплемента, концентрация одного или нескольких белковых биомаркеров, связанных с aHUS, может быть измерена в одной или нескольких биологических жидкостях, полученных от индивидуума. Если концентрация одного или более белковых биомаркеров не нормализуется и/или остается повышенной, практикующий врач может выбрать для введения индивидууму один или более дополнительных вторичных агентов (например, противовоспалительных агентов), направленных на любые патофизиологические эффекты, возникающие в результате повышенной концентрации биомаркеров.

Ингибитор комплемента может представлять собой любой из описанных в настоящем документе ингибиторов. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов ингибитор представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, небольшую молекулу, полипептид, аналог полипептида, пептидомиметик или аптамер. В

некоторых вариантах осуществления ингибитор может представлять собой ингибитор, который ингибирует один или более из компонентов комплемента C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, фактор D, фактор В, пропердин, MBL, MASP-1, MASP-2, или биологически активные фрагменты любого из перечисленного выше. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов ингибитор комплемента ингибирует одно или оба события - возникновение анафилактической активности, связанной с C5a, и/или сборку мембраноатакующего комплекса, связанную с C5b.

Композиции могут также содержать природные или растворимые формы ингибирующих комплемент соединений, такие как CR1, LEX-CR1, MCP, DAF, CD59, фактор H, фактор яда кобры, FUT-175, комплестатин и K76 COOH.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов ингибитор комплемента представляет собой антагонистическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть выбран из группы, состоящей из гуманизированного антитела, рекомбинантного антитела, диатела, химеризированного или химерного антитела, моноклонального антитела, деиммунизированного антитела, полностью человеческого антитела, одноцепочечного антитела, фрагмента Fv, фрагмента Fd, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента и F(ab')₂-фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов антагонистическое антитело представляет собой антитело против C5, такое как экулизумаб. В некоторых вариантах осуществления антагонистическое антитело представляет собой пекселезумаб, C5-связывающий фрагмент антитела против C5.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов ингибитор комплемента выбран из группы, состоящей из MB12/22, MB12/22-RGD, ARC187, ARC1905, SSL7 и OmCI.

В некоторых вариантах осуществления антикоагулянт выбран из группы, состоящей из: кумарина, гепарина, ингибитора фактора

Ха и ингибитора тромбина. Примеры антикоагулянтов включают, например, варфарин (кумадин), аспирин, гепарин, фениндион, фондапаринукс, идрапаринукс и ингибиторы тромбина (например, аргатробан, лепирудин, бивалирудин или дабигатран).

В некоторых вариантах осуществления фибринолитический агент выбран из группы, состоящей из анкрода, α -аминокапроновой кислоты, антиплазмина- α_1 , простациклина и дефибротида.

В некоторых вариантах осуществления противовоспалительный агент представляет собой антицитокиновый агент, такой как антагонистическое антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент) или растворимый рецептор цитокина, который связывается с воспалительным цитокином и ингибирует активность цитокина. Антицитокиновый агент может представлять собой, например, ингибитор TNF (например, антитело против TNF или растворимый рецепторный белок TNF) или агент против CD20.

Противовоспалительные агенты также включают, например, стероиды (например, дексаметазон), нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) (например, индометацин, напроксен, сулиндак, диклофенак, аспирин, флурбипрофен, оксaproзин, салсалак, дифунизал, пироксикам, этодолак, меклофенамат, ибупрофен, фенопрофен, кетопрофен, мелоксикам, толметин, холинсалицилат магния, ингибиторы COX-2, антагонисты TNF-альфа (этанерцепт, адалимумаб, инфликсимаб, голимумаб), модифицирующие заболевание противоревматические препараты (DMARDS) (например, сульфасалазин, метотрексат), циклоспорин, ретиноиды и кортикостероиды.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу определения того, повышается ли концентрация одного или более белковых биомаркеров, связанных с aHUS, у больного, страдающего атипичным гемолитическим уремическим синдромом (aHUS), предположительно страдающего aHUS или находящегося в состоянии риска его развития, где способ включает: (i) измерение в биологическом образце, полученном от больного, концентрации каждого из, по меньшей мере, двух биомаркеров, связанных с aHUS, из таблицы 11 (ниже), т.е. выбранных из группы, состоящей из: протеолитического фрагмента фактора В, C5a, растворимого

C5b-9 (SC5b-9), растворимого TNFR1 (sTNFR1), растворимого VCAM-1 (sVCAM-1), тромбомодулина, фрагментов 1 и 2 протромбина (F1+2), D-димера, кластерины, TIMP-1, FABP-1, бета-2-микроглобулина ($\beta 2m$) и цистатина-С, и (ii) определение того, имеется ли у больного повышенная концентрация каждого, по меньшей мере, из двух биомаркеров, связанных с aHUS, по сравнению с нормальной контрольной концентрацией тех же, по меньшей мере, двух биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, два белковых биомаркера, связанных с aHUS, измеряют с использованием иммуноанализа, такого как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) или радиоиммуноанализ (RIA). Биологическая жидкость может представлять собой, например, кровь, фракцию крови (например, плазму или сыворотку) или мочу. Понятно, что любые сочетания любых двух или более (например, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, 10, 11 или 12) указанных биомаркеров aHUS могут быть измерены и проанализированы в соответствии с методами, описанными в настоящем документе.

В другом аспекте изобретение относится к способу диагностирования больного как страдающего атипичным гемолитическим уремический синдромом (aHUS) (или подтверждения диагноза aHUS, например, когда больной соответствует двум или более критериям включения, обсуждаемым в примере 1), где способ включает: (i) измерение в биологическом образце, полученном от больного с подозрением на наличие aHUS или с риском развития aHUS, концентрации каждого, по меньшей мере, из двух биомаркеров, связанных с aHUS, выбранных из группы, состоящей из: протеолитического фрагмента фактора В, C5a, растворимого C5b-9 (SC5b-9), растворимого TNFR1 (sTNFR1), растворимого VCAM-1 (sVCAM-1), тромбомодулина, фрагментов 1 и 2 протромбина (F1+2), D-димера, кластерины, TIMP-1, FABP-1, бета-2-микроглобулина ($\beta 2m$) и цистатина-С, и (ii) диагностирование больного как имеющего aHUS (или подтверждение диагноза aHUS), если концентрация каждого, по меньшей мере, из двух биомаркеров, связанных с aHUS, увеличена по сравнению с

нормальной контрольной концентрацией тех же, по меньшей мере, двух биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, два белковых биомаркера, связанных с aHUS, измеряют с использованием иммуноанализа, такого как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) или радиоиммуноанализ (RIA). Биологическая жидкость может представлять собой, например, кровь, фракции крови (например, плазму или сыворотку) или мочу. Понятно, что любые сочетания любых двух или более (например, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, 10, 11 или 12) указанных биомаркеров aHUS могут быть измерены и проанализированы в соответствии с методами, описанными в настоящем документе.

Нормальная контрольная концентрации при применении в любом из описанных в настоящем документе способов может представлять собой (или может быть основана), например, на концентрации данного белкового биомаркера, связанного с aHUS, в биологическом образце или биологических образцах, полученных от одного или более (например, от двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или более) здоровых индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация биомаркера может представлять собой (или может быть основана), например, на концентрации биомаркера в объединенном образце, полученном от двух или более (например, от двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или более) здоровых индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, объединенные образцы могут быть от здоровых индивидуумов или, по меньшей мере, от индивидуумов, которые не имеют или как предполагается не имеют (не находятся в состоянии риска развития) aHUS. Например, определение того, является ли индивидуум индивидуумом, который страдает aHUS, может включать сравнение измеренной концентрации одного или более белковых компонентов комплемента (например, таблицы 1 или таблицы 11) в биологическом образце (или в нескольких различных типах биологических образцов), полученном от больного, и сравнение

измеренной концентрации со средней концентрацией тех же белков в объединенных образцах здоровых индивидуумов. Такие контрольные концентрации у здоровых людей могут представлять собой в некоторых вариантах осуществления диапазон значений, или медиану, или среднюю величину, полученную из диапазона.

В некоторых вариантах осуществления концентрация, по меньшей мере, одного биомаркера, связанного с aHUS, измеряется в двух или более типах биологической жидкости. В некоторых вариантах осуществления концентрация первого из указанных, по меньшей мере, двух белковых биомаркеров aHUS измеряется в одном типе биологической жидкости, а концентрация второго, по меньшей мере, из двух белковых биомаркеров aHUS измеряется во втором типе жидкости.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряют концентрацию протеолитического фрагмента фактора В. Фрагмент может представлять собой, например, Ва. Биологический образец может представлять собой образец плазмы. Как описано в таблице 11, нормальная контрольная концентрации Ва может составлять менее 1000 нг/мл. Нормальная контрольная концентрация Ва может составлять менее 600 нг/мл. Нормальная контрольная концентрация Ва может составлять от 300 до 600 нг/мл.

В некоторых вариантах осуществления концентрация Ва в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в два раза выше нормальной контрольной концентрации Ва. В некоторых вариантах осуществления концентрация Ва в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в пять раз выше нормальной контрольной концентрации Ва. В некоторых вариантах осуществления концентрация Ва в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 1500 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация Ва в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 2500 нг/мл.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряется концентрация C5a.

Биологический образец, в котором измеряется C5a, может представлять собой образец мочи. И в некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация C5a составляет менее 2 нг на мг креатинина мочи. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация C5a составляет менее 1 нг на мг креатинина мочи. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация C5a находится между 0 и 0,7 нг на мг креатинина мочи.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрация C5a в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в два раза выше нормальной контрольной концентрации C5a. В некоторых вариантах осуществления концентрация C5a в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в десять раз выше нормальной контрольной концентрации C5a. В некоторых вариантах осуществления концентрация C5a в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в сорок раз выше нормальной контрольной концентрации C5a. В некоторых вариантах осуществления концентрация C5a в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 5 нг на мг креатинина мочи. В некоторых вариантах осуществления концентрация C5a в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 9 нг на мг креатинина мочи.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряется концентрация sC5b-9. Биологический образец, в котором измеряется sC5b-9, может представлять собой образец мочи. И в некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация sC5b-9 составляет менее 2 нг на мг креатинина мочи. Нормальная контрольная концентрация sC5b-9 может составлять менее 1 нг на мг креатинина мочи. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация sC5b-9 находится между 0 и 0,6 нг на мг креатинина мочи.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрация sC5b-9 в

биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в десять раз выше нормальной контрольной концентрации sC5b-9. В некоторых вариантах осуществления концентрация sC5b-9 в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в пятьдесят раз выше нормальной контрольной концентрации sC5b-9. В некоторых вариантах осуществления концентрация sC5b-9 в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в сто раз выше нормальной контрольной концентрации sC5b-9. В некоторых вариантах осуществления концентрация sC5b-9 в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 20 нг на мг креатинина мочи. В некоторых вариантах осуществления концентрация sC5b-9 в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 30 нг на мг креатинина мочи.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряется концентрация sTNFR1. Биологический образец, в котором измеряется sTNFR1, может представлять собой образец сыворотки. И в некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация sTNFR1 составляет менее 2000 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация sTNFR1 составляет менее 1500 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация sTNFR1 находится между 400 и 1500 пг/мл.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрация sTNFR1 в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в два раза выше нормальной контрольной концентрации sTNFR1. В некоторых вариантах осуществления концентрация sTNFR1 в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в пять раз выше нормальной контрольной концентрации sTNFR1. В некоторых вариантах осуществления концентрация sTNFR1 в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в пятнадцать раз выше нормальной контрольной концентрации sTNFR1.

В некоторых вариантах осуществления концентрация sTNFR1 в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 10000 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация sTNFR1 в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 15000 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряется концентрация sVCAM-1. Биологический образец, в котором измеряется sVCAM-1, может представлять собой образец сыворотки. И в некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация sVCAM-1 составляет менее 500 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация sVCAM-1 составляет менее 300 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация sVCAM-1 составляет от 100 до 500 нг/мл.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрация sVCAM-1 в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, на 10% выше нормальной контрольной концентрации sVCAM-1. В некоторых вариантах осуществления концентрация sVCAM-1 в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, на 30% выше нормальной контрольной концентрации sVCAM-1. В некоторых вариантах осуществления концентрация sVCAM-1 в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, на 50% выше нормальной контрольной концентрации sVCAM-1. В некоторых вариантах осуществления концентрация sVCAM-1 в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 550 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация sVCAM-1 в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 650 нг/мл.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряется концентрация тромбомодулина. Биологический образец, в котором измеряется тромбомодулин, может представлять собой образец плазмы. И в

некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация тромбомодулина составляет менее 5 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация тромбомодулина составляет менее 3 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация тромбомодулина составляет от 2 до 6 нг/мл.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрация тромбомодулина в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, на 10% выше нормальной контрольной концентрации тромбомодулина. В некоторых вариантах осуществления концентрация тромбомодулина в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, на 30% выше нормальной контрольной концентрации тромбомодулина. В некоторых вариантах осуществления концентрация тромбомодулина в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, на 50% выше нормальной контрольной концентрации тромбомодулина. В некоторых вариантах осуществления концентрация тромбомодулина в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 8 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация тромбомодулина в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 10 нг/мл.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряется концентрация F1+2. Биологический образец, в котором измеряется F1+2, может представлять собой образец плазмы. И в некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация F1+2 составляет менее 400 пмоль/л. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация F1+2 составляет менее 300 пмоль/л. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация F1+2 составляет от 50 до 400 пмоль/л.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрация F1+2 в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, на

30% выше нормальной контрольной концентрации F1+2. В некоторых вариантах осуществления концентрация F1+2 в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, на 50% выше нормальной контрольной концентрации F1+2. В некоторых вариантах осуществления концентрация F1+2 в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, на 100% выше нормальной контрольной концентрации F1+2. В некоторых вариантах осуществления концентрация F1+2 в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 900 пмоль/л. В некоторых вариантах осуществления концентрация F1+2 в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 1000 пмоль/л.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрация измеряется D-димера. Биологический образец, в котором измеряется D-димер, может представлять собой образец плазмы. И в некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация D-димера составляет менее 500 мкг/л. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация D-димера составляет менее 400 мкг/л. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация D-димера составляет от 100 до 500 мкг/л.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрация D-димера в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в два раза выше нормальной контрольной концентрации D-димера. В некоторых вариантах осуществления концентрация D-димера в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в пять раз выше нормальной контрольной концентрации D-димера. В некоторых вариантах осуществления концентрация D-димера в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в десять раз выше нормальной контрольной концентрации D-димера. В некоторых вариантах осуществления концентрация D-димера в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 1500 мкг/л. В некоторых вариантах

осуществления концентрация D-димера в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 2500 мкг/л.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряется концентрация кластерина. Биологический образец, в котором измеряется кластерин, может представлять собой образец мочи. И в некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация кластерина составляет менее 500 нг на мг креатинина мочи. Нормальная контрольная концентрация кластерина может составлять, например, менее 400 нг на мг креатинина мочи. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация кластерина находится между 0 и 500 нг на мг креатинина мочи.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрация кластерина в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в два раза выше нормальной контрольной концентрации кластерина. В некоторых вариантах осуществления концентрация кластерина в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в пять раз выше нормальной контрольной концентрации кластерина. В некоторых вариантах осуществления концентрация кластерина в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в десять раз выше нормальной контрольной концентрации кластерина. В некоторых вариантах осуществления концентрация кластерина в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 900 нг на мг креатинина мочи. В некоторых вариантах осуществления концентрация кластерина в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 1200 нг на мг креатинина мочи.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряется концентрация TIMP-1. Биологический образец, в котором измеряется TIMP-1, может представлять собой образец мочи. И в некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация TIMP-1

составляет менее 10 нг на мг креатинина мочи. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация TIMP-1 составляет менее 5 нг на мг креатинина мочи. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация TIMP-1 находится между 0 и 10 нг на мг креатинина мочи.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрация TIMP-1 в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в два раза выше нормальной контрольной концентрации TIMP-1. В некоторых вариантах осуществления концентрация TIMP-1 в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в десять раз выше нормальной контрольной концентрации TIMP-1. В некоторых вариантах осуществления концентрация TIMP-1 в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в двадцать раз выше нормальной контрольной концентрации TIMP-1. В некоторых вариантах осуществления концентрация TIMP-1 в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 15 нг на мг креатинина мочи. В некоторых вариантах осуществления концентрация TIMP-1 в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 20 нг на мг креатинина мочи.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряется концентрация FABP-1 (также обозначаемого в настоящем документе как L-FABP-1). Биологический образец, в котором измеряется C5a, может представлять собой образец мочи. И в некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация FABP-1 составляет менее 20 нг на мг креатинина мочи. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация FABP-1 составляет менее 15 нг на мг креатинина мочи. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация FABP-1 находится между 0 и 20 нг на мг креатинина мочи.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрация FABP-1 в

биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в два раза выше нормальной контрольной концентрации FABP-1. В некоторых вариантах осуществления концентрация FABP-1 в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в десять раз выше нормальной контрольной концентрации FABP-1. В некоторых вариантах осуществления концентрация FABP-1 в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в двадцать раз выше нормальной контрольной концентрации FABP-1. В некоторых вариантах осуществления концентрация FABP-1 в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 40 нг на мг креатинина мочи. В некоторых вариантах осуществления концентрация FABP-1 в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 50 нг на мг креатинина мочи.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряется концентрация $\beta 2m$. Биологический образец, в котором измеряется $\beta 2m$, может представлять собой образец мочи. И в некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация $\beta 2m$ составляет менее 5 мкг на мг креатинина мочи. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация $\beta 2m$ составляет менее 3 мкг на мг креатинина мочи. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация $\beta 2m$ находится между 0 и 5 мкг на мг креатинина мочи.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрация $\beta 2m$ в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в два раза выше нормальной контрольной концентрации $\beta 2m$. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрация $\beta 2m$ в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в десять раз выше нормальной контрольной концентрации $\beta 2m$. В некоторых вариантах осуществления концентрация $\beta 2m$ в биологическом

образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в двадцать раз выше нормальной контрольной концентрации β_2m . В некоторых вариантах осуществления концентрация β_2m в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 15 мкг на мг креатинина мочи. В некоторых вариантах осуществления концентрация β_2m в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 20 мкг на мг креатинина мочи.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряется концентрация цистатина-С. Биологический образец, в котором измеряется цистатин-С, может представлять собой образец мочи. И в некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация цистатина-С составляет менее 400 нг на мг креатинина мочи. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация цистатина-С составляет менее 300 нг на мг креатинина мочи. В некоторых вариантах осуществления нормальная контрольная концентрация цистатина-С находится между 0 и 400 нг на мг креатинина мочи.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов концентрация цистатина-С в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в два раза выше нормальной контрольной концентрации цистатина-С. В некоторых вариантах осуществления концентрация цистатина-С в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в десять раз выше нормальной контрольной концентрации цистатина-С. В некоторых вариантах осуществления концентрация цистатина-С в биологическом образце считается повышенной, когда она, по меньшей мере, в двадцать раз выше нормальной контрольной концентрации цистатина-С. В некоторых вариантах осуществления концентрация цистатина-С в биологическом образце считается повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 900 нг на мг креатинина мочи. В некоторых вариантах осуществления концентрация цистатина-С в биологическом образце считается

повышенной, когда она составляет, по меньшей мере, 1200 нг на мг креатинина мочи.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряются концентрации двух или более из протеолитических фрагментов фактора В, C5a и sC5b-9. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряются концентрации C5a и sC5b-9. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряются концентрации sVCAM-1 и тромбомодулина. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряются концентрации F1+2 и D-димера. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов измеряются концентрации двух или более из кластерина, TIMP-1, $\beta 2m$, FABP-1 и цистатина-С.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу оценки уровня активации альтернативного пути у больного, страдающего aHUS, больного с предполагаемым наличием aHUS, или находящегося в состоянии риска развития aHUS, до, во время или после лечения ингибитором комплемента, таким как антитело против C5. Способ включает: измерение концентрации протеолитического фрагмента фактора В (например, Ba или Bb) в биологическом образце, полученном от больного, которого лечили ингибитором комплемента (например, ингибитором компонента C5 комплемента человека, таким как антитело против C5).

В еще одном аспекте изобретение относится к способу определения того, реагирует ли больной на лечение ингибитором комплемента (например, характеризуется ли снижением риска развития тромбоза или характеризуется уменьшением количества, частоты или наличия тромботической микроангиопатии), причем способ включает измерение концентрации одного или более биомаркеров тромбоза или свертывания, приведенных в таблице 1 или 11, например, F1+2, D-димера, vWF или тромбомодулина, в биологическом образце, полученном от больного с повышенным риском развития тромботической микроангиопатии (ТМА),

страдающего этим заболеванием, или с подозрением на него, которого лечили ингибитором комплемента; и определение наличия реакции больного на лечение, если концентрация одного или более биомаркеров в биологическом образце уменьшается по сравнению с концентрацией одного или более биомаркеров в биологическом образце того же типа, полученном от больного до лечения ингибитором комплемента, или определение отсутствия реакции больного на лечение, если концентрация одного или более биомаркеров в биологическом образце не уменьшается по сравнению с концентрацией одного или более биомаркеров в биологическом образце того же типа, полученном от больного до лечения ингибитором комплемента. В некоторых вариантах осуществления больной страдает aHUS, у больного предполагается наличие aHUS, или он находится в состоянии риска развития aHUS.

В другом аспекте изобретение относится к способу определения того, реагирует ли больной aHUS на лечение ингибитором комплемента, причем способ включает измерение концентрации одного или более биомаркеров терминальной активации комплемента, представленных в таблице 1 или 11, например, C5a и/или SC5b-9, в биологическом образце, полученном от больного, страдающего aHUS, с подозрением на его наличие или с риском его развития, которого лечили ингибитором комплемента (например, антителом против C5); и определение наличия реакции больного на лечение, если концентрация одного или более биомаркеров в биологическом образце снижается по сравнению с концентрацией одного или более биомаркеров в биологическом образце того же типа, полученном от больного до лечения ингибитором комплемента, или определение отсутствия реакции больного на лечение, если концентрация одного или более биомаркеров в биологическом образце не снижается по сравнению с концентрацией одного или более биомаркеров в биологическом образце того же типа, полученном от больного до лечения ингибитором комплемента. Таким образом, этот способ может быть использован для оценки или мониторинга блокады терминального каскада комплемента у больного aHUS, которого лечили ингибитором комплемента. В вариантах осуществления, в которых

больной не реагирует на лечение или менее чувствителен к нему, способ может также включать изменение величины дозы или частоты введения дозы ингибитора комплемента или выбор отличного ингибитора комплемента (например, ингибитора активации C3) для использования при лечении больного.

В другом аспекте изобретение относится к способу определения того, реагирует ли больной аHUS на лечение ингибитором комплемента, причем способ включает измерение концентрации одного или более биомаркеров воспаления сосудов или активации эндотелия, приведенных в таблице 1 или 11, например, sTNFR1, sVCAM-1 или тромбомодулина, в биологическом образце, полученном от больного, страдающего аHUS, с подозрением на его наличие или с риском его развития; и определение наличия реакции больного на лечение, если концентрация одного или более биомаркеров в биологическом образце снижается по сравнению с концентрацией одного или более биомаркеров в биологическом образце того же типа, полученном от больного до лечения ингибитором комплемента, или определение отсутствия реакции больного на лечение, если концентрация одного или более биомаркеров в биологическом образце не снижается по сравнению с концентрацией одного или более биомаркеров в биологическом образце того же типа, полученном от больного до лечения ингибитором комплемента. Таким образом, способ может быть использован для оценки или мониторинга воспаления сосудов у больного аHUS, которого лечили ингибитором комплемента. В вариантах осуществления, в которых больной не реагирует на лечение или менее чувствителен к нему, способ может также включать изменение величины дозы или частоты введения дозы ингибитора комплемента или выбор отличного ингибитора комплемента (например, ингибитора активации C3) для использования при лечении больного.

В другом аспекте изобретение относится к способу определения того, реагирует ли больной аHUS на лечение ингибитором комплемента, причем способ включает измерение концентрации одного или более биомаркеров повреждения почек, приведенных в таблице 1 или 11, например, кластерина, TIMP-1,

FABP-1, $\beta 2m$ и/или цистатина-С, в биологическом образце, полученном от больного, страдающего aHUS, с подозрением на его наличие или с риском его развития; и определение наличия реакции больного на лечение, если концентрация одного или более биомаркеров в биологическом образце снижается по сравнению с концентрацией одного или более биомаркеров в биологическом образце того же типа, полученном от больного до лечения ингибитором комплемента, или определение отсутствия реакции больного на лечение, если концентрация одного или более биомаркеров в биологическом образце не снижается по сравнению с концентрацией одного или более биомаркеров в биологическом образце того же типа, полученном от больного до лечения ингибитором комплемента. Таким образом, способ может быть использован для оценки или мониторинга повреждения почек у больного aHUS, которого лечили ингибитором комплемента. В вариантах осуществления, в которых больной не реагирует на лечение или менее чувствителен к нему, способ может также включать изменение величины дозы или частоты введения дозы ингибитора комплемента или выбор отличного ингибитора комплемента (например, ингибитора активации C3) для использования при лечении больного.

Изобретатели также обнаружили, что у больных aHUS относительное повышение концентраций биомаркеров терминальной активации комплемента C5a и sC5b-9 (например, концентраций в моче) гораздо выше, чем относительное повышение уровней маркеров альтернативных путей активации комплемента (например, Ba) у этих больных. Это значит, что медиана концентрации C5a и sC5b-9 у больных aHUS была в 45 и 305 раз выше, соответственно, чем медиана концентрации этих маркеров у нормальных здоровых людей, в то время как медиана концентрации Ba была только приблизительно в 5 раз выше, чем медиана концентрации Ba у нормальных здоровых людей. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией или механизмом действия, авторы изобретения полагают, что отношение терминальной активации комплемента к активации альтернативного пути является полезным

диагностическим инструментом для aHUS. Таким образом, в другом аспекте изобретение относится к способу диагностики aHUS или к подтверждению диагноза aHUS, где способ включает сравнение уровня терминальной активации комплемента (например, sC5b-9 или C5a) относительно уровня активации вышележащего альтернативного пути (например, Ba или Bb) (по отношению к нормальным здоровым людям), где более высокий уровень терминальной активации по отношению к активации альтернативного пути является показателем того, что больной страдает aHUS. Например, соотношение, свидетельствующее об aHUS, может составлять, например, приблизительно 45:5 или 305:5 кратности индукции терминальной активации комплемента к кратности индукции активации альтернативного пути. Кроме того, изобретатели полагают, что это соотношение может быть полезно для различения aHUS от других заболеваний, связанных с комплементом, таких как, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП), которые не могут индуцировать такое различие в уровнях терминальной активации комплемента и активации вышележащего альтернативного пути.

«Полипептид», «пептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и означают любую цепь аминокислот, связанную пептидными связями, независимо от длины или посттрансляционной модификации. Белки, описанные в настоящем документе, могут содержать или представлять собой белки дикого типа или могут представлять собой варианты, которые имеют не более 50 (например, не более одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, или 50) консервативных аминокислотных замен. Консервативные замены обычно включают замены в пределах следующих групп: глицин и аланин; валин, изолейцин и лейцин; аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; аспарагин, глутамин, серин и треонин; лизин, гистидин и аргинин; и фенилаланин и тирозин.

Используемый в данном описании процент (%) идентичности аминокислотной последовательности определяется как процент аминокислот в кандидатной последовательности, которые идентичны аминокислотам в эталонной последовательности после выравнивания

последовательностей и введения пробелов, если это необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательности. Выравнивание в целях определения процента идентичности последовательности может быть достигнуто различными способами, которые известны специалистам в данной области техники, например, с использованием доступного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST. Соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей, могут быть определены с помощью известных способов.

При использовании в настоящем документе термин «антитело» включает как полноразмерные антитела, так и антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных антител. Полноразмерные антитела включают различные изотипы антител, включая антитела IgM, IgG, IgA, IgD и IgE. Термин «антитело» включает поликлональное антитело, моноклональное антитело, химеризированное или химерное антитело, гуманизированное антитело, приматизированное антитело, деиммунизированное антитело и полностью человеческое антитело. Антитело может быть получено или может происходить от любого из множества видов, например, млекопитающих, таких как люди, приматы, не относящиеся к человеку (например, орангутанг, бабуины или шимпанзе), лошади, крупный рогатый скот, свиньи, овцы, козы, собаки, кошки, кролики, морские свинки, песчанки, хомяки, крысы и мыши. Антитело может представлять собой очищенное или рекомбинантное антитело.

При использовании в настоящем документе, термин «фрагмент антитела», «антигенсвязывающий фрагмент» или аналогичные термины относятся к фрагменту антитела, который сохраняет способность связываться с антигеном-мишенью (например, C5 человека) и ингибировать активность антигена-мишени. Такие фрагменты включают, например, одноцепочечное антитело, одноцепочечный Fv фрагмент (scFv), фрагмент Fd, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент или F(ab')₂-фрагмент. Фрагмент scFv представляет собой одноцепочечную полипептидную цепь, которая включает

вариабельные области как тяжелой, так и легкой цепей антитела, из которого произошел scFv. Кроме того, интратела, минитела, триатела и диатела также включаются в определение антитела и совместимы с использованием в способах, описанных в настоящем документе. Смотри, например, статьи Todorovska et al. (2001) J Immunol Methods 248(1):47-66; Hudson and Kortt (1999) J Immunol Methods 231(1):177-189; Poljak (1994) Structure 2(12):1121-1123; и Rondon and Marasco (1997) Annual Review of Microbiology 51:257-283, раскрытие каждой из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме. Биспецифические антитела (включая антитела DVD-Ig; смотри ниже), также охватываются термином «антитело». Биспецифические антитела представляют собой моноклональные антитела предпочтительно человека или гуманизированные антитела, которые обладают специфичностью связывания в отношении, по меньшей мере, двух различных антигенов.

При использовании в настоящем документе термин «антитело» также включает, например, однодоменные антитела, такие как однодоменные антитела верблюда. Смотри, например, Muyldermans et al. (2001) Trends Biochem Sci 26:230-235; Nuttall et al. (2000) Curr Pharm Biotech 1:253-263; Riechmann et al. (1999) J Immunol Meth 231:25-38; публикацию заявок PCT nos. WO 94/04678 и WO 94/25591; и патент США no. 6005079, все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления в изобретении предлагаются однодоменные антитела, включающие два домена VH с модификациями, так что образуются однодоменные антитела.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, что и обычно понимаемое специалистом с обычной квалификацией в области, к которой относится данное раскрытие. Предпочтительные способы и вещества описаны ниже, хотя способы и вещества, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, также могут быть использованы в практике или при тестировании описанных в настоящем документе способов и композиций. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки,

упомянутые в настоящем документе, включены в качестве ссылки в полном объеме.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения, например, способы лечения нарушений, связанных с комплементом, у индивидуума будут очевидны из нижеследующего описания, примеров и из формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1А представляет собой точечную диаграмму, демонстрирующую концентрацию C5a (в нг/мг креатина мочи) в моче больных aHUS как перед лечением экулизумабом (Pre-Tx) так и через различное количество недель после начала лечения экулизумабом. Концентрацию C5a в моче измеряли также в моче нормальных, здоровых индивидуумов (NORM).

Фиг. 1В представляет собой точечную диаграмму, демонстрирующую концентрацию sC5b-9 (в нг/мг креатина мочи) в моче больных aHUS как перед лечением экулизумабом (Pre-Tx) так и через различное количество недель после начала лечения экулизумабом. Концентрацию C5b9 в моче измеряли также в моче нормальных, здоровых индивидуумов (NORM).

Фиг. 1С представляет собой точечную диаграмму, демонстрирующую концентрацию компонента Ba комплемента (в нг/мл) в плазме больных aHUS как перед лечением экулизумабом (Pre-Tx) так и через различное количество недель после начала лечения экулизумабом. Концентрацию Ba измеряли также в плазме нормальных, здоровых индивидуумов (нормальные).

Фиг. 1D представляет собой гистограмму, изображающую средний процент (%) снижения уровня C5a в моче (ось Y) в зависимости от времени у больных aHUS (N=26) после начала лечения экулизумабом. На оси X представлены недели визита больного aHUS для обследования после начала лечения, например, V3 представляет собой визит больного для обследования через 3 недели после начала лечения.

Фиг. 1Е представляет собой гистограмму, изображающую средний процент (%) снижения уровня sC5b-9 в моче (ось Y) в зависимости от времени у больных aHUS (N=23) после начала лечения экулизумабом. На оси X представлены недели визита

больного aHUS для обследования после начала лечения, например, V3 представляет собой визит больного для обследования через 3 недели после начала лечения.

Фиг. 1F представляет собой гистограмму, изображающую средний процент (%) снижения уровня Ва в плазме (ось Y) в зависимости от времени у больных aHUS (N=35) после начала лечения экулизумабом. На оси X представлены недели визита больного aHUS для обследования после начала лечения, например, V3 представляет собой визит больного для обследования через 3 недели после начала лечения.

Фиг. 2A-2C представляют собой гистограммы, изображающие процент больных aHUS, которые достигают нормализованных концентраций C5a в моче (фиг. 2A), sC5b9 в моче (фиг. 2B) и Ва в плазме (фиг. 2C), исходно (перед лечением экулизумабом) и через разное количество недель после начала лечения экулизумабом.

Фиг. 3A представляет собой точечную диаграмму, демонстрирующую концентрацию фрагмента 1+2 протромбина (в пмоль/л) в плазме больных aHUS как перед лечением экулизумабом (Pre-Tx), так и через разное количество недель после начала лечения экулизумабом. Концентрацию F1+2 измеряли также в плазме нормальных, здоровых индивидуумов (нормальные).

Фиг. 3B представляет собой точечную диаграмму, демонстрирующую концентрацию D-димера (в мкг/л) в плазме больных aHUS как перед лечением экулизумабом (Pre-Tx) так и через разное количество недель после начала лечения экулизумабом. Концентрацию D-димера измеряли также в плазме нормальных, здоровых индивидуумов (нормальные).

Фиг. 3C представляет собой гистограмму, изображающую средний процент (%) снижения уровня фрагмента F1+2 протромбина в плазме (ось Y) в зависимости от времени у больных aHUS после начала лечения экулизумабом. На оси X представлены недели визита больного aHUS для обследования после начала лечения, например, V3 представляет собой визит больного для обследования через 3 недели после начала лечения.

Фиг. 3D представляет собой гистограмму, изображающую

средний процент (%) снижения уровня d-димера в плазме (ось Y) в зависимости от времени у больных аHUS после начала лечения экулизумабом. На оси X представлены недели визита больного аHUS для обследования после начала лечения, например, V3 представляет собой визит больного для обследования через 3 недели после начала лечения.

Фиг. 4А и 4В представляют собой гистограммы, изображающие процент больных аHUS, которые достигают нормализованных концентраций фрагмента F1+2 протромбина в плазме (фиг. 4А) и D-димера в плазме (фиг. 4В) исходно (перед лечением экулизумабом) и через разное количество недель после начала лечения экулизумабом.

Фиг. 5А представляет собой точечную диаграмму, демонстрирующую концентрацию тромбомодулина (в нг/мл) в плазме (в плазме, обработанной ЭДТА) больных аHUS как перед лечением экулизумабом (Pre-Tx) так и через разное количество недель после начала лечения экулизумабом. Концентрацию тромбомодулина в плазме измеряли также в плазме нормальных, здоровых индивидуумов (нормальные). EOS обозначает результаты анализа образцов, полученных при «окончании исследования».

Фиг. 5В представляет собой точечную диаграмму, демонстрирующую концентрацию VCAM-1 (в нг/мл) в сыворотке больных аHUS как перед лечением экулизумабом (Pre-Tx) так и через разное количество недель после начала лечения экулизумабом. Концентрацию сывороточного VCAM-1 измеряли также в сыворотке нормальных, здоровых индивидуумов (пул нормальных). EOS обозначает результаты анализа образцов, полученных при «окончании исследования».

Фиг. 5С представляет собой точечную диаграмму, демонстрирующую активность vWF (в мЕ/мл) в плазме (в плазме, обработанной ЭДТА) больных аHUS как перед лечением экулизумабом (Pre-Tx) так и через разное количество недель после начала лечения экулизумабом. Активность vWF измеряли также в плазме нормальных, здоровых индивидуумов (нормальные). EOS обозначает результаты анализа образцов, полученных при «окончании исследования».

Фиг. 6А и 6В представляют собой гистограммы, изображающие процент больных аHUS, которые достигают нормализованных концентраций тромбомодулина в плазме (фиг. 6А) и уровней активности vWF в плазме (фиг. 4В), исходно (перед лечением экулизумабом) и через разное количество недель после начала лечения экулизумабом.

Фиг. 6С представляет собой гистограмму, изображающую средний процент (%) снижения уровня тромбомодулина в плазме (ось Y) в зависимости от времени у больных аHUS (N=33) после начала лечения экулизумабом. На оси X представлены недели визита больного аHUS для обследования после начала лечения, например, V3 представляет собой визит больного для обследования через 3 недели после начала лечения.

Фиг. 6D представляет собой гистограмму, изображающую средний процент (%) снижения уровня VCAM-1 в сыворотке (ось Y) в зависимости от времени у больных аHUS (N=36) после начала лечения экулизумабом. На оси X представлены недели визита больного аHUS для обследования после начала лечения, например, V3 представляет собой визит больного для обследования через 3 недели после начала лечения.

Фиг. 7А представляет собой точечную диаграмму, демонстрирующую концентрацию TNFR1 (в пг/мл) в сыворотке больных аHUS как перед лечением экулизумабом (Pre-Tx) так и через разное количество недель после начала лечения экулизумабом. Концентрацию сывороточного TNFR1 измеряли также в сыворотке нормальных, здоровых индивидуумов (пул нормальных). EOS обозначает результаты анализа образцов, полученных при «окончании исследования».

Фиг. 7В представляет собой гистограмму, изображающую процент больных аHUS, которые достигают нормализованных концентраций TNFR1 в сыворотке, исходно (перед лечением экулизумабом) и через разное количество недель после начала лечения экулизумабом.

Фиг. 8А представляет собой точечную диаграмму, демонстрирующую концентрацию цистатина С (CysC) (в нг/мг креатина мочи) в моче больных аHUS как перед лечением

экулизумабом (Pre-Tx), так и через различное количество недель после начала лечения экулизумабом. Концентрацию CysC в моче измеряли также в моче нормальных, здоровых индивидуумов (NORM).

Фиг. 8B представляет собой точечную диаграмму, демонстрирующую концентрацию $\beta 2M$ (в мкг/мг креатина мочи) в моче больных aHUS как перед лечением экулизумабом (Pre-Tx), так и через различное количество недель после начала лечения экулизумабом. Концентрацию $\beta 2M$ в моче измеряли также в моче нормальных, здоровых индивидуумов (NORM).

Фиг. 8C представляет собой точечную диаграмму, демонстрирующую концентрацию NGAL (в нг/мг креатина мочи) в моче больных aHUS как перед лечением экулизумабом (Pre-Tx), так и через различное количество недель после начала лечения экулизумабом. Концентрацию NGAL в моче измеряли также в моче нормальных, здоровых индивидуумов (NORM).

Фиг. 9A-9E представляют собой серию гистограмм, изображающих средние уровни нескольких белковых биомаркеров aHUS у больных aHUS, которые находились на диализе (диализ), по сравнению с теми больными aHUS, которые не находились на диализе (без диализа), перед включением в исследование, описанное в настоящем документе. На фиг. 9A изображена средняя концентрация TNFR1 в сыворотке (в пг/мл); на фиг. 9B изображена средняя концентрация $\beta 2M$ в моче (в мкг/мг креатина мочи); на фиг. 9C изображена концентрация Ba в плазме (в нг/мл); на фиг. 9D изображена концентрация sC5b9 в моче (в нг/мг креатина мочи); и на фиг. 9E изображена концентрация C5a в моче (в нг/мл).

Фиг. 10A представляет собой точечную диаграмму, демонстрирующую концентрацию TNFR1 в сыворотке (в пг/мл) у больных aHUS, характеризующихся стабильными клиническими показателями (клиническая ремиссия) (без TMA), и у тех больных aHUS, которые продолжают иметь повышенные уровни гаптоглобина и LDH (и пониженное количество тромбоцитов) (Другие), как исходно, так и через от 1 до 2,5 недель после начала лечения экулизумабом. Показаны также концентрации сывороточного TNFR1 у

нормальных, здоровых индивидуумов (нормальные).

Фиг. 10B-10E представляют собой серию гистограмм, каждая из которых изображает концентрацию данного биомаркера у больных с нормальными гематологическими маркерами LDH и гаптоглобином («нормальные больные» или больные, рассматриваемые как находящиеся в состоянии клинической ремиссии), у больных с аномальными (повышенными) гематологическими маркерами («аномальные больные» или больные с активной презентацией aHUS) и у здоровых индивидуумов («нормальные»). На фиг. 10B изображены уровни Ва в плазме (нг/мл) у этих популяций индивидуумов. На фиг. 10C изображен уровень сывороточного VCAM-1 (нг/мл) у этих популяций индивидуумов. На фиг. 10E изображен уровень фрагментов 1+2 протромбина (пмоль/л) в плазме у этих популяций индивидуумов, и на фиг. 10D изображен уровень D-димера в плазме (в мкг/л). Величины Р для сравнения соответствующих групп показаны на фигурах.

Фиг. 10F-10I представляют собой серию гистограмм, каждая из которых изображает концентрацию данного биомаркера у больных с нормальным уровнем тромбоцитов («нормальные больные»), у больных с аномальным (сниженным) уровнем тромбоцитов («аномальные больные»), и у здоровых индивидуумов («нормальные»). На фиг. 10F изображены уровни Ва в плазме (нг/мл) у этих популяций индивидуумов. На фиг. 10G изображен уровень сывороточного VCAM-1 (нг/мл) у этих популяций индивидуумов. На фиг. 10I изображен уровень фрагментов 1+2 протромбина (пмоль/л) в плазме у этих популяций индивидуумов, и на фиг. 10H изображен уровень D-димера в плазме (в мкг/л). Величины Р для сравнения соответствующих групп показаны на фигурах.

Фиг. 11 представляет собой гистограмму, изображающую среднее изменение в процентах уровней TNFR1 в сыворотке и кластерина, C5a и C5b9 в моче тех больных aHUS, которые достигают полного ответа ТМА, и тех больных, которые все еще испытывают осложнения ТМА (неполный ответ). (Как отмечено и подробно рассмотрено в рабочих примерах, полный ответ ТМА относится к нормализации гематологических параметров и

сохранению функции почек).

Фиг. 12 представляет собой гистограмму, изображающую среднее изменение в процентах уровней Ва в плазме больных аHUS, которых лечили экулизумабом, характеризующихся полным ответом ТМА, и тех больных аHUS, которых лечили экулизумабом, которые не характеризуются полным ответом (другие).

Фиг. 13 представляет собой гистограмму, изображающую среднее изменение от исходного (первоначальный визит до начала лечения экулизумабом) количества тромбоцитов ($10^9/\text{л}$) через 12-17 недель и 26 недель после начала лечения экулизумабом у больных аHUS с нормализованными уровнями Ва в плазме по сравнению с больными с постоянно повышенными уровнями Ва в плазме. Величины p для каждого наблюдения также представлены на фигуре.

Фиг. 14A-14D представляют собой серию гистограмм, отражающих выявление того, что некоторые биомаркеры, связанные с аHUS, повышены у больных аHUS с аномальными маркерами ТМА на исходном уровне. На фиг. 14A изображена концентрация цистатина С (CysC) (в нг/мг креатина мочи) в моче больных аHUS с нормальным количеством тромбоцитов (>150000 на мкл крови) по сравнению с больными с пониженным количеством тромбоцитов (<150000 на мкл крови). На фиг. 14B изображена концентрация кластерина (в нг/мг креатина мочи) в моче больных аHUS с нормальным количеством тромбоцитов (>150000 на мкл крови) по сравнению с больными с пониженным количеством тромбоцитов (<150000 на мкл крови). На фиг. 14C изображена концентрация VCAM-1 в сыворотке крови больных аHUS с нормальным уровнем LDH по сравнению с больными с повышенным уровнем LDH. На фиг. 14D изображена концентрация D-димера (в мкг/л) в плазме крови больных аHUS с нормальным уровнем LDH по сравнению с больными с повышенным уровнем LDH. Величины p для каждого наблюдения представлены на фигурах.

Фиг. 15 представляет собой гистограмму, изображающую уровень цистатина С (нг/мг креатина мочи) в моче больных аHUS на исходном уровне, получавших терапию плазмой (повторная РТ, N=23), без терапии плазмой (без РТ, N=3), или нормальных

больных (N=9).

Фиг. 16 представляет собой серию гистограмм, изображающих среднее изменение исходной eGFR (мл/мин/1,73 м²) у больных aHUS, которые достигают нормализованных уровней различных биомаркеров (Ba плазмы, VCAM-1 сыворотки, F1+2 плазмы, d-димера плазмы и цистатина С мочи) после лечения экулизумабом по сравнению с больными aHUS, у которых концентрация этих биомаркеров остается повышенной.

Фиг. 17А-Е представляют собой серию гистограмм, отражающих выявление того, что некоторые биомаркеры, связанные с aHUS, повышены у больных aHUS перед лечением ингибитором комплемента, независимо от того, получали ли больные лечение плазмаферезом (PE) или инфузией плазмы (PI). На фиг. 17А изображена концентрация протеолитического фрагмента Ba фактора В (в нг/мл) в плазме нормальных здоровых добровольцев (NHV), больных aHUS, получавших лечение PE или PI (PE/PI), или больных aHUS, не получавших лечение PE/PI (без PE/PI). На фиг. 17В изображена концентрация sTNFR1 (в пг/мл) в сыворотке нормальных здоровых добровольцев (NHV), больных aHUS, получавших лечение PE или PI (PE/PI), или больных aHUS, не получавших лечение PE/PI (без PE/PI). На фиг. 17С изображена концентрация sVCAM-1 (в нг/мл) в сыворотке нормальных здоровых добровольцев (NHV), больных aHUS, получавших лечение PE или PI (PE/PI), или больных aHUS, не получавших лечение PE/PI (без PE/PI). На фиг. 17D изображена концентрация D-димера (в мкг/л) в плазме нормальных здоровых добровольцев (NHV), больных aHUS, получавших лечение PE или PI (PE/PI), или больных aHUS, не получавших лечение PE/PI (без PE/PI). На фиг. 17Е изображена концентрация цистатина-С (в нг/мг креатинина мочи) в моче нормальных здоровых добровольцев (NHV), больных aHUS, получавших лечение PE или PI (PE/PI), или больных aHUS, не получавших лечение PE/PI (без PE/PI). Величины ρ для каждого наблюдения представлены на фигурах.

Фиг. 18А-Е представляют собой серию гистограмм, отражающих выявление того, что некоторые биомаркеры, связанные с aHUS, повышены у больных aHUS перед лечением ингибитором комплемента, независимо от уровня тромбоцитов у больных. На фиг. 18А

изображена концентрация протеолитического фрагмента Ва фактора В (в нг/мл) в плазме нормальных здоровых добровольцев (NHV), больных аHUS, имеющих нормальный уровень тромбоцитов ($>150 \times 10^9$), или больных аHUS, имеющих пониженное количество тромбоцитов ($<150 \times 10^9$). На фиг. 18В изображена концентрация sTNFR1 (в пг/мл) в сыворотке нормальных здоровых добровольцев (NHV), больных аHUS, имеющих нормальный уровень тромбоцитов ($>150 \times 10^9$), или больных аHUS, имеющих пониженное количество тромбоцитов ($<150 \times 10^9$). На фиг. 18С изображена концентрация sVCAM-1 (в нг/мл) в сыворотке нормальных здоровых добровольцев (NHV), больных аHUS, имеющих нормальный уровень тромбоцитов ($>150 \times 10^9$), или больных аHUS, имеющих пониженное количество тромбоцитов ($<150 \times 10^9$). На фиг. 18D изображена концентрация D-димера (в мкг/л) в плазме нормальных здоровых добровольцев (NHV), больных аHUS, имеющих нормальный уровень тромбоцитов ($>150 \times 10^9$), или больных аHUS, имеющих пониженное количество тромбоцитов ($<150 \times 10^9$). На фиг. 18Е изображена концентрация цистатина-С (в нг/мг креатинина мочи) нормальных здоровых добровольцев (NHV), больных аHUS, имеющих нормальный уровень тромбоцитов ($>150 \times 10^9$), или больных аHUS, имеющих пониженное количество тромбоцитов ($<150 \times 10^9$). Величины p для каждого наблюдения представлены на фигурах.

Фиг. 19А-Е представляют собой серию гистограмм, отражающих выявление того, что некоторые биомаркеры, связанные с аHUS, повышены у больных аHUS перед лечением ингибитором комплемента, независимо от уровней гаптоглобина (Hp) или лактатдегидрогеназы (LDH). На фиг. 19А изображена концентрация протеолитического фрагмента Ва фактора В (в нг/мл) в плазме нормальных здоровых добровольцев (NHV), больных аHUS, имеющих нормальные уровни LDH и Hp, или больных аHUS, имеющих повышенные (аномальные) HP/LDH. На фиг. 19В изображена концентрация sTNFR1 (в пг/мл) в сыворотке нормальных здоровых добровольцев (NHV), больных аHUS, имеющих нормальные уровни LDH и Hp, или больных аHUS, имеющих повышенные (аномальные) HP/LDH. На фиг. 19С изображена

концентрация sVCAM-1 (в нг/мл) в сыворотке нормальных здоровых добровольцев (NHV), больных aHUS, имеющих нормальные уровни LDH и Hp, или больных aHUS, имеющих повышенные (аномальные) HP/LDH. На фиг. 19D изображена концентрация D-димера (в мкг/л) в плазме нормальных здоровых добровольцев (NHV), больных aHUS, имеющих нормальные уровни LDH и Hp, или больных aHUS, имеющих повышенные (аномальные) HP/LDH. На фиг. 19E изображена концентрация цистатина-С (в нг/мг креатинина мочи) в моче нормальных здоровых добровольцев (NHV), больных aHUS, имеющих нормальные уровни LDH и Hp, или больных aHUS, имеющих повышенные (аномальные) HP/LDH. Величины p для каждого наблюдения представлены на фигурах.

Фиг. 20А-В представляют собой диаграммы типа ящика с усами, изображающие лонгитудинальные эффекты продолжительного лечения экулизумабом на терминальную активацию комплемента у больных aHUS. На фиг. 20А показано изменение во времени концентрации C5a в моче (нг/мг креатинина мочи) больных aHUS после лечения экулизумабом по сравнению с концентрацией C5a в моче нормальных здоровых добровольцев (NHV). На фиг. 20В показано изменение во времени концентрации sC5b-9 в моче (нг/мг креатинина мочи) больных aHUS после лечения экулизумабом по сравнению с концентрацией sC5b-9 в моче нормальных здоровых добровольцев (NHV). Диаграммы типа ящика с усами представляют собой медиану, 25 и 75 процентиля и размах. *Первая точка времени, в которой уровни были значительно снижены по сравнению с исходным уровнем (BL); величины P относительно исходного уровня в каждой временной точке рассчитывали с использованием подхода ограниченного максимального правдоподобия на основе повторных измерений (смешанная модель). Величины P по сравнению с NHV рассчитывали с использованием теста рангового критерия Вилкоксона.

Фиг. 21А-С представляют собой диаграммы типа ящика с усами, изображающие лонгитудинальные эффекты продолжительного лечения экулизумабом на концентрацию белковых биомаркеров, связанных с повреждением почек, у больных aHUS. На фиг. 21А показано изменение во времени концентрации FABP-1 в моче (нг/мг

креатинина мочи) больных aHUS после лечения экулизумабом по сравнению с концентрацией FABP-1 в моче нормальных здоровых добровольцев (NHV). На фиг. 21B показано изменение во времени концентрации цистатина-С в моче (нг/мг креатинина мочи) больных aHUS после лечения экулизумабом по сравнению с концентрацией FABP-1 в моче нормальных здоровых добровольцев (NHV). На фиг. 21C показано изменение во времени концентрации кластерина в моче (нг/мг креатинина мочи) больных aHUS после лечения экулизумабом по сравнению с концентрацией FABP-1 в моче нормальных здоровых добровольцев (NHV). Диаграммы типа ящика с усами представляют собой медиану, 25 и 75 процентиля и размах. *Первая точка времени, в которой уровни были значительно снижены по сравнению с исходным уровнем (BL); величины Р относительно исходного уровня в каждой временной точке рассчитывали с использованием подхода ограниченного максимального правдоподобия на основе повторных измерений (смешанная модель). Величины Р по сравнению с NHV рассчитывали с использованием теста рангового критерия Вилкоксона.

Фиг. 22 представляет собой диаграмму типа ящика с усами, изображающую лонгитудинальное влияние продолжительного лечения экулизумабом на активацию альтернативного пути комплемента у больных aHUS. Показано изменение во времени концентрации Ва (нг/мл) в плазме больных aHUS после лечения экулизумабом вместе с концентрацией Ва в плазме нормальных здоровых добровольцев (NHV). Диаграммы типа ящика с усами представляют собой медиану, 25 и 75 процентиля и размах. *Первая точка времени, в которой уровни были значительно снижены по сравнению с исходным уровнем (BL); величины Р относительно исходного уровня в каждой временной точке рассчитывали с использованием подхода ограниченного максимального правдоподобия на основе повторных измерений (смешанная модель). Величины Р по сравнению с NHV рассчитывали с использованием теста рангового критерия Вилкоксона.

Фиг. 23А-С представляют собой диаграммы типа ящика с усами, изображающие лонгитудинальное влияние продолжительного лечения экулизумабом на концентрацию белковых биомаркеров,

связанных с воспалением, активацией эндотелиальных клеток и повреждением ткани, у больных aHUS. На фиг. 23А показано изменение во времени концентрации sTNFR1 (пг/мл) в сыворотке больных aHUS после лечения экулизумабом по сравнению с концентрацией sTNFR1 в сыворотке нормальных здоровых добровольцев (NHV). На фиг. 23В показано изменение во времени концентрации sVCAM-1 (нг/мл) в сыворотке больных aHUS после лечения экулизумабом по сравнению с концентрацией анализируемого вещества в сыворотке нормальных здоровых добровольцев (NHV). На фиг. 23С показано изменение во времени концентрации тромбомодулина (нг/мл) в плазме больных aHUS после лечения экулизумабом по сравнению с концентрацией анализируемого вещества в плазме нормальных здоровых добровольцев (NHV). Диаграммы типа ящика с усами представляют собой медиану, 25 и 75 процентиля и размах. *Первая точка времени, в которой уровни были значительно снижены по сравнению с исходным уровнем (BL); величины Р относительно исходного уровня в каждой временной точке рассчитывали с использованием подхода ограниченного максимального правдоподобия на основе повторных измерений (смешанная модель). Величины Р по сравнению с NHV рассчитывали с использованием теста рангового критерия Вилкоксона.

Фиг. 24А-В представляют собой диаграммы типа ящика с усами, изображающие лонгитудинальное влияние продолжительного лечения экулизумабом на концентрацию белковых биомаркеров, связанных с тромбозом и свертыванием, у больных aHUS. На фиг. 24А показано изменение во времени концентрации F1+2 (пмоль/л) в плазме больных aHUS после лечения экулизумабом по сравнению с концентрацией анализируемого вещества в плазме нормальных здоровых добровольцев (NHV). На фиг. 24В показано изменение во времени концентрации D-димера (мкг/л) в плазме больных aHUS после лечения экулизумабом по сравнению с концентрацией анализируемого вещества в плазме нормальных здоровых добровольцев (NHV). Диаграммы типа ящика с усами представляют собой медиану, 25 и 75 процентиля и размах. *Первая точка времени, в которой уровни были значительно снижены по сравнению

с исходным уровнем (BL); величины P относительно исходного уровня в каждой временной точке рассчитывали с использованием подхода ограниченного максимального правдоподобия на основе повторных измерений (смешанная модель). Величины P по сравнению с NHV рассчитывали с использованием теста рангового критерия Вилкоксона.

ОБЗОР СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА

Система комплемента действует в сочетании с другими иммунологическими системами организма для защиты от вторжения клеточных и вирусных патогенов. Существует, по меньшей мере, 25 белков комплемента, которые находятся в совокупной коллекции белков плазмы и мембранных кофакторов. Белки плазмы составляют приблизительно 10% глобулинов сыворотки крови позвоночных. Компоненты комплемента реализуют свои иммунные защитные функции путем взаимодействия в сериях сложного, но точного ферментативного расщепления и событий связывания с мембраной. Результирующий каскад комплемента приводит к образованию продуктов с опсонической, иммунорегуляторной и литической функциями. Краткий обзор биологической активности, связанной с активацией комплемента предлагается, например, в 16-м издании руководства Merck.

Каскад комплемента развивается по классическому пути, альтернативному пути, или лектиновому пути. Эти пути имеют много компонентов и, хотя они отличаются на первоначальных стадиях, они сходятся и имеют одни и те же компоненты «терминального комплемента» (C5 через C9), ответственные за активацию и разрушение клеток-мишеней.

Классический путь (CP), как правило, инициируется узнаванием антителом антигенного сайта на клетке-мишени и связыванием с ним. Альтернативный путь (AP) может быть не зависимым от антитела и может инициироваться определенными молекулами на поверхности патогена. Кроме того, лектиновый путь обычно инициируется связыванием связанного с маннозой лектина (MBL) с субстратами с высоким содержанием маннозы. Эти пути сходятся в точке, где компонент C3 комплемента расщепляется с помощью активной протеазы с получением C3a и C3b. Другие пути,

активирующие воздействие комплемента, могут действовать позже в последовательности событий, ведущих к различным аспектам функции комплемента. С3а представляет собой анафилатоксин. С3b связывается с бактериальными и другими клетками, а также с определенными вирусами и иммунными комплексами, и метит их для удаления из циркуляции. Эта опсоническая функция С3b обычно рассматривается как являющаяся наиболее важной для противоинфекционного действия системы комплемента. С3b также образует комплекс с другими компонентами, уникальными для каждого пути, с образованием классической или альтернативной С5 конвертазы, которая расщепляет компонент С5 комплемента (в дальнейшем обозначаемый как «С5») до С5а и С5b.

Расщепление С5 высвобождает биологически активные компоненты, такие как, например, С5а, мощный анафилатоксин и фактор хемотаксиса, и С5b, который через серии белковых взаимодействий приводит к образованию терминального литического комплекса комплемента, С5b-9. С5а и С5b-9 также имеют плеiotропные свойства в отношении активации клеток путем усиления высвобождения нижележащих воспалительных факторов, таких как гидролитические ферменты, активные формы кислорода, метаболиты арахидоновой кислоты и различные цитокины.

С5b при взаимодействии с С6, С7 и С8 образует комплекс С5b-8 на поверхности клетки-мишени. При связывании нескольких молекул С9 образуется мембраноатакующий комплекс (МАС, С5b-9, терминальный комплекс комплемента – ТСС). Когда достаточное количество МАСs встраивается в мембраны клеток-мишеней, отверстия, которые они создают (поры МАС), опосредуют быстрый осмотический лизис клеток-мишеней. Более низкие, нелитические концентрации МАСs могут осуществлять другие эффекты. В частности, встраивание небольшого количества комплексов С5b-9 в мембраны эндотелиальных клеток и тромбоцитов может вызвать неблагоприятную активацию клеток. В некоторых случаях активация может предшествовать клеточному лизису.

Как упоминалось выше, С3а и С5а активируются компонентами комплемента. Это может вызвать дегрануляцию тучных клеток, которые высвобождают гистамин из базофилов и тучных клеток, и

другие медиаторы воспаления, приводя в результате к сокращению гладких мышц, повышению сосудистой проницаемости, активации лейкоцитов и к другим воспалительным явлениям, включая клеточную пролиферацию, ведущую к избытку клеток. C5a также функционирует как пептид хемотаксиса, который служит для привлечения провоспалительных гранулоцитов к месту активации комплемента. Рецепторы C5a обнаружены на поверхности бронхиальных и альвеолярных эпителиальных клеток и бронхиальных гладкомышечных клеток. Рецепторы C5a обнаружены также на эозинофилах, тучных клетках, моноцитах, нейтрофилах и активированных лимфоцитах.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Как описано в настоящем документе и проиллюстрировано в рабочих примерах, изобретатели идентифицировали биомаркеры aHUS. Например, обнаружено, что повышенная или, в некоторых случаях, пониженная концентрация некоторых белков связана с наличием aHUS. Аналогично, пониженная или повышенная концентрация (или активность) определенных белков в биологической жидкости, полученной от больного aHUS, которого лечили ингибитором комплемента, указывает на то, что больной реагирует на лечение ингибитором. Соответственно, анализ концентрации и/или уровня активности таких белков может быть использован для оценки, среди прочего, риска развития aHUS, диагностики aHUS, мониторинга прогрессии или ослабления aHUS, и/или контроля ответа на лечение ингибитором комплемента.

БЕЛКОВЫЕ БИОМАРКЕРЫ aHUS И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Белковые биомаркеры aHUS (а также иллюстративные биологические жидкости, в которых они находятся), представлены в таблице 1. Белковая последовательность, связанная с названием каждого из биомаркеров, перечисленных в таблице 1, из GenBank (национального центра информации по биотехнологии (NCBI)), как доступная из имеющихся в наличии на дату подачи настоящей заявки, включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Таблица 1.

Биомаркер	Сокр.	Тканевой источник			Seq no.*
		Сыворотка	Плазма	Моча	ссылка NCBI
Маркеры воспаления/активации тромбоцитов или эндотелиальных клеток					
Лиганд 9 цитокинов (мотив C-X-C)	CXCL9	X			NP_002407.1
Лиганд 10 хемокинов (мотив C-X-C)	CXCL-10	X			NP_001556.2
Интерлейкин-1- бета	IL-1β	X			NP_000567.1
Интерлейкин-6	IL-6	X			NP_000591.1
Интерлейкин-8	IL-8	X			NP_000575.1
Интерлейкин-12 p70	IL-12 p70	X			NP_000873.2 (p35) NP_002178.2 (p40)
Интерферон- гамма	IFN-γ	X			NP_000610.2
Селектин тромбоцитов	p-селектин	X			NP_002996.2
Селектин эндотелия	e-селектин	X			NP_000441.2
Молекула-1 межклеточной адгезии	ICAM-1	X			NP_000192.2
Молекула-1 адгезии клеток сосудов	VCAM-1	X			NP_001069.1
Белок-1 хемотаксиса моноцитов	MCP-1	X			NP_002973.1
Фактор роста эндотелия сосудов	VEGF	X			NP_001020537.2

Регулируемый при активации, экспрессируемый и секретируемый нормальными Т- клетками (CCL5)	CCL5	X			NP_002976.2
Растворимый лиганд CD40	sCD40L	X			NP_000065.1**
Растворимый рецептор 1 фактора некроза опухолей	sTNFR1	X			NP_001056.1**
Интерлейкин 18	IL-18	X			NP_001553.1
Маркеры воспаления/повреждения почек					
Ассоциированный с желатиназой нейтрофилов липокалин	NGAL			X	NP_005555.2
Молекула-1 повреждения почек	KIM-1			X	NP_001092884.1
Остеопонтин	OPN			X	NP_001035147.1
Тканевой ингибитор металлопротеаз- 1	TIMP-1			X	NP_003245.1
Интерлейкин-18	IL-18			X	Выше
Лиганд хемокина 9 (мотив C-X-C)	CXCL9			X	Выше
Лиганд хемокина 10 (мотив C-X-C)	CXCL10			X	Выше
Кластерин	CLU			X	NP_001822.3
Цистатин С	CysC			X	NP_000090.1
Альбумин	ALB			X	NP_000468.1

Печеночный белок, связывающие жирные кислоты	L-FABP			X	NP_001434.1
бета-2- микроглобин	β 2M			X	NP_004039.1
Трехлистый фактор 3	TFF-3			X	NP_003217.3
N-ацетил-бета- D- глюкозаминидаза	NAG			X	NP_000511.2
π -глутатион-S- трансфераза	π -GST			X	NP_000843.1
альфа- глутатион-S- трансфераза	α -GST			X	NP_665683.1
Комплемент					
Комплемент Ва	Ва		X		SEQ ID NO:1; Смотри также фиг. 2 Morley and Campbell (1984) EMBO J 3(1):153-157.
Комплемент C3a	C3a		X		SEQ ID NO:2
Комплемент C5a	C5a		X	X	SEQ ID NO:3
Растворимый MAC	sC5b9		X	X	NA
CH ₅₀ (гемолиз)	CH ₅₀	X			NA
Комплемент C5	C5	X	X		NP_001726.2
Тромбоз/свертывание					
D-димер	D-димер		X		P02671***

Протромбин F1+2	F1+2		X		Фрагмент 1 активации (SEQ ID NO:4) соответствует аминокислотам 44-198 SEQ ID NO:6. Фрагмент 2 активации (SEQ ID NO:5) соответствует аминокислотам 199-327 SEQ ID NO:4.
Фактор фон Виллебранда	vWF		X		NP_000543.2
Активность фактора фон Виллебранда	Активность vWF		X		та же
Тромбомодулин	TM		X		NP_000352.1

*Номер поступления NCBI иллюстративной последовательности человека предлагается для каждого белкового биомаркера, приведенного в таблице.

**Растворимая форма рецептора генерируется в результате протеолитического процессинга связанной с мембраной формы рецептора.

***UniProtKB (консорциум: European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK; Swiss Institute of Bioinformatics; Geneva, Switzerland; и Protein Information Resource, Washington, D.C.) обозначение для фибриногена-альфа человека, который расщепляется под действием тромбина с образованием фибрина. D-димер представляет собой продукт деградации фибрина. Описание перехода фибриногена в фибрин и его в D-димер в результате расщепления изложено в статье Soheir et al. (2009) Blood 113(13):2878-2887, раскрытие которой, по меньшей мере, в отношении образования D-димера включено в настоящий документ в полном объеме.

Биологические маркеры, предлагаемые в настоящем документе, могут быть использованы отдельно или в сочетании в качестве показателя, например, для оценки риска развития aHUS,

диагностики aHUS, определения того, испытывает ли индивидуум первое острое проявление aHUS, мониторинга прогрессии или ослабления aHUS и/или контроля реакции на лечение ингибитором комплемента или оптимизации такого лечения. В некоторых вариантах осуществления могут быть использованы отдельные белковые биомаркеры aHUS, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления могут быть использовано, по меньшей мере, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, или 25, или более) белковых биомаркеров aHUS, выбранных из таблицы 1, в сочетании в виде панели.

В некоторых вариантах осуществления белковые биомаркеры aHUS выбраны из протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента (например, Ва или Вb), растворимого C5b9 (sC5b9), тромбомодулина, VCAM-1, фактора фон Виллебранда (vWF), растворимого лиганда CD40 (sCD40L), фрагмента F1+2 протромбина, D-димера, CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , ICAM-1, IL-1-бета, IL-12 p70, компонента C5a комплемента, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина С, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, фактора роста клеток эндотелия сосудов (VEGF), IL-6, альбумина, IL-8 и CCL5. Может быть измерена концентрация и/или активность одного или более из биомаркеров таблицы 1 (или любых из подгрупп биомаркеров, указанных в настоящем документе).

В некоторых вариантах осуществления повышение концентрации D-димера по отношению к концентрации D-димера в нормальном контрольном образце и повышение концентрации FABP-1 по отношению к концентрации FABP-1 в нормальном контрольном образце указывает на то, что у больного aHUS наблюдается первое острое проявление aHUS. В некоторых случаях повышение одного или обоих из этих белковых биомаркеров aHUS представляет собой значительное повышение по сравнению с нормальным контролем.

В некоторых вариантах осуществления повышение концентрации одного или более из TNFR1, Ва, C5b-9, F1+2, β 2M, кластерина, TIMP-1, NGAL, CysC и C5a (смотри таблицу 7) в биологическом

образце, полученном от больного aHUS, по отношению к контрольным концентрациям анализируемых веществ, полученным, например, в пуле образцов от больных aHUS, которые не находились на повторном диализе, указывает на то, что больной представляет собой больного, который находился на повторном диализе.

В некоторых вариантах осуществления повышение концентрации одного или обоих из C5a и FABP-1 (например, C5a и FABP-1 в моче) в биологическом образце, полученном от больного aHUS, по отношению к контрольным концентрациям анализируемых веществ, полученным, например, в пуле образцов от больных aHUS, которым не проводилась трансплантация почки, указывает на то, что больной представляет собой больного, которому проводилась трансплантация почки.

В некоторых вариантах осуществления повышение концентрации цистатина С (например, цистатина С в моче) в биологическом образце, полученном от больного aHUS, по отношению к контрольной концентрации анализируемого вещества, полученной, например, в пуле образцов от больных aHUS, которые не получали повторное лечение плазмой, указывает на то, что больной представляет собой больного, который получал повторное лечение плазмой.

В некоторых вариантах осуществления снижение концентрации Ва после лечения (например, концентрации Ва в плазме), по меньшей мере, на 10 (например, по меньшей мере, на 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50)% по отношению к концентрации Ва в пробе биологической жидкости того же типа, полученной от индивидуума до начала лечения, указывает на то, что индивидуум достиг или может достичь полного тромбомикроангиопатического (ТМА) ответа (т.е., прекращения осложнений ТМА). В некоторых вариантах осуществления снижение происходит через 12 недель после начала лечения ингибитором комплемента. В некоторых вариантах осуществления снижение происходит в пределах 12-17 недель после начала лечения ингибитором комплемента. В некоторых вариантах осуществления снижение происходит в пределах 26 недели после начала лечения ингибитором комплемента.

В некоторых вариантах осуществления снижение после лечения одного или обоих из CCL5 и sCD40L, по меньшей мере, на 10 (например, по меньшей мере, на 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50)% относительно соответствующей концентрации в образце(ах) биологической жидкости того же типа, полученной от индивидуума до начала лечения, указывает на то, что индивидуум достиг или может достичь увеличения количества тромбоцитов (например, восстановления тромбоцитов). В некоторых вариантах осуществления снижение после лечения концентрации Ва (например, концентрации Ва в плазме), по меньшей мере, на 10 (например, по меньшей мере, на 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50)% (или нормализации концентраций Ва) по отношению к концентрации Ва в образце биологической жидкости того же типа, полученной от индивидуума до начала лечения, указывает на то, что индивидуум достиг или может достичь полного тромбомикроангиопатического (ТМА) ответа (т.е., прекращения осложнений ТМА).

В некоторых вариантах осуществления состояние одного или более биомаркеров aHUS, описанных в настоящем документе, может служить для предсказания улучшения расчетной скорости клубочковой фильтрации (eGFR) у больного aHUS, которого лечат ингибитором комплемента. Например, снижение концентрации F1+2 протромбина (например, в пределах 4, 5 или 6 недель после начала лечения при хронической схеме лечения) и/или D-димера (например, в пределах 12, 13, 14, 15, 16, или 17 недель после начала лечения при хронической схеме лечения) указывает на то, что больной aHUS, которого лечат ингибитором комплемента, достиг или может достичь клинически значимого улучшения eGFR. На достижение или вероятное достижение клинически значимого улучшения eGFR указывает также нормализация концентраций IL-6 и IFN- γ (например, в пределах 4, 5 или 6 недель после начала лечения ингибитором комплемента при хронической схеме лечения). На достижение или вероятное достижение клинически значимого улучшения eGFR указывает также нормализация Ва, CXCL9, CXCL10 и концентрации vWF (например, в пределах 12, 13, 14, 15, 16, или 17 недель после начала лечения ингибитором комплемента при

хронической схеме лечения). В некоторых вариантах осуществления на достижение или вероятное достижение клинически значимого улучшения eGFR указывает также нормализация концентрации Ba , CXCL9, CXCL10, $\beta 2\text{M}$ (например, в моче), CysC (например, в моче), vWF, d-димера, кластерина (например, в моче) и/или FABP-1 (например, в моче) (например, в пределах 26 недель после начала лечения ингибитором комплемента при хронической схеме лечения).

Методы мониторинга или оценки состояния одного или более белковых биомаркеров, связанных с атипичным гемолитическим уремическим синдромом (aHUS), у индивидуума (например, млекопитающего, например, человека) включают: измерение в биологической жидкости, полученной от индивидуума одного или обоих из (i) концентрации, по меньшей мере, одного (например, по меньшей мере, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) белковых биомаркеров, связанных с aHUS, в биологической жидкости.

Измерение или определение уровней экспрессии белка в биологическом образце может быть выполнено любым подходящим способом (смотри, например, Harlow and Lane (1988) «Antibodies: A Laboratory Manual», Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY). В общем, уровни белка определяют путем контактирования биологического образца, полученного от индивидуума, со связывающими агентами одного или более белковых биомаркеров aHUS; определения в образце (например, биологической жидкости) уровней одного или более белковых биомаркеров aHUS, которые связываются со связывающими агентами; и сравнения уровней одного или более белковых биомаркеров aHUS в образце с уровнями соответствующих белковых биомаркеров в контрольном образце (например, в нормальном образце). В некоторых вариантах осуществления подходящий связывающий агент представляет собой рибосому с пептидным компонентом или без него, молекулу РНК или полипептид (например, полипептид, который включает полипептидную последовательность белкового

маркера, его пептидного варианта или непептидного миметика такой последовательности).

Подходящие связывающие агенты также включают антитела, специфичные для белковых биомаркеров aHUS, описанные в настоящем документе (например, антитело, специфичное для любого биомаркера, представленного в таблице 1). Подходящие антитела для применения в способах по настоящему изобретению, включают моноклональные и поликлональные антитела и антигенсвязывающие фрагменты (например, Fab фрагменты или scFvs) антител. Антитела, включая моноклональные и поликлональные антитела, фрагменты и гибриды, могут быть получены с использованием методов, известных в данной области техники (смотри, например, Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256:495-497; Kozbor et al. (1985) *J Immunol Methods* 81:31-42; Cote et al. (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2026-203; и Zhang et al. (2002) *J Biol Chem* 277:39379-39387). Антитела для использования в способах по настоящему изобретению, могут быть очищены способами, хорошо известными в данной области техники. Антитела могут быть также получены из коммерческих источников.

В некоторых вариантах осуществления связывающий агент прямо или непрямо метят регистрируемой частью. Роль регистрируемого агента состоит в облегчении стадии детектирования в диагностическом методе, в результате возможности визуализации комплекса, образованного путем связывания связывающего агента с белковым маркером (или его фрагментом). Регистрируемый агент может быть выбран таким образом, чтобы он генерировал сигнал, который можно измерить и интенсивность которого связана (предпочтительно пропорциональна) количеству белкового маркера, присутствующего в анализируемом образце. Способы промечивания биологических молекул, таких как полипептиды и антитела, хорошо известны в данной области техники. Любой из широкого разнообразия регистрируемых агентов может быть использован в практике настоящего изобретения. Подходящие регистрируемые агенты включают, но не ограничиваются этим: различные лиганды, радионуклиды, флуоресцентные красители, хемилюминесцентные

агенты, микрочастицы (такие как, например, квантовые точки, нанокристаллы, люминофоры и тому подобное), ферменты (такие как, например, ферменты, используемые в ELISA, т.е. пероксидаза хрена, бета-галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), колориметрические метки, магнитные метки и биотин, дигоксигенин или другие гаптены и белки, для которых доступны антисыворотки или моноклональные антитела.

В некоторых вариантах осуществления связывающие агенты (например, антитела) могут быть иммобилизованы на носителе или подложке (например, шарике, магнитной частице, латексной частице, лунке планшета для микротитрования, кювете или другом реакционном сосуде). Примеры подходящих носителей или вспомогательных веществ включают агарозу, целлюлозу, нитроцеллюлозу, декстран, сефадекс®, сефарозу®, липосомы, карбоксиметилцеллюлозу, полиакриламиды, полистирол, габбро, фильтровальную бумагу, магнетит, ионообменную смолу, полиэтиленовую пленку, пластиковую пробирку, стекло, сополимер полиаминметилвинилового эфира и малеиновой кислоты, сополимер аминокислот, сополимер этилена и малеиновой кислоты, нейлон, шелк и тому подобное. Связывающие агенты могут быть иммобилизованы не прямо, а с помощью второго связывающего агента, специфичного для первого связывающего агента (например, антитела мыши, специфичные для белковых маркеров, могут быть иммобилизованы с помощью специфического антитела овцы против Fc-фрагмента IgG мыши, нанесенного на носитель или подложку).

Уровни экспрессии белка в биологическом образце могут быть определены с использованием иммуноанализов. Примеры таких анализов включают флуоресцентный иммуноанализ с временным разрешением (TR-FIA), радиоиммуноанализ, иммуноферментный анализ (например, ELISA), иммунофлуоресцентную иммунопреципитацию, латексную агглютинацию, гемагглютинацию, Вестерн-блоттинг и гистохимические анализы, которые являются обычными методами, хорошо известными в данной области техники. Методы регистрации и количественной оценки сигнала, генерируемого комплексом, образованным путем связывания связывающего агента с белковым маркером, должны зависеть от

природы анализа и от регистрируемой части молекулы (например, флуоресцентной части).

В одном примере присутствие или уровень экспрессии белка с гена (например, белковых биомаркеров aHUS, представленных в таблице 1) могут быть определены с использованием метода вестерн-блоттинга. Например, из биологического образца может быть получен лизат, или сам биологический образец (например, биологическая жидкость) может контактировать с буфером Лэммли и подвергаться электрофорезу в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE). Белки, разделенные по размеру с помощью SDS-PAGE, могут быть затем перенесены на мембранный фильтр (например, нитроцеллюлозу) и определены с помощью методов иммуноблоттинга с использованием регистрируемого меченого антитела, специфичного для белка, представляющего интерес. Присутствие или количество связанного регистрируемого меченого антитела указывает на присутствие или количество белка в биологическом образце.

В другом примере иммуноанализ может быть использован для выявления и/или измерения уровня экспрессии белка белкового биомаркера aHUS (например, биомаркера, представленного в таблице 1). Как и выше, в целях выявления иммуноанализ может быть осуществлен с использованием антитела, которое несет регистрируемую метку (например, флуоресцентный агент или фермент). Белки из биологического образца могут быть конъюгированы прямо с твердофазным матриксом (например, с многолуночным планшетом для анализа, нитроцеллюлозой, агарозой, Сефарозой®, кодируемыми частицами или магнитными шариками) или они могут быть конъюгированы с первым членом специфически связывающейся пары (например, с биотином или стрептавидином), который прикрепляется к твердофазному матриксу при связывании со вторым членом специфически связывающейся пары (например, со стрептавидином или биотином). Такое прикрепление к твердой фазе матрикса позволяет очищать белки от других мешающих или лишних компонентов биологического образца перед контактом с детектирующим антителом, а также позволяет впоследствии отмыть несвязанное антитело. В этом случае, как и выше, присутствие

или количество связанного регистрируемого меченого антитела указывает на присутствие или количество белка в биологическом образце.

Альтернативно, уровни экспрессии белка могут быть определены с использованием методов, основанных на масс-спектрометрии, или методов, основанных на визуализации, известных в данной области техники для обнаружения белков. Другие подходящие методы включают 2D-гель-электрофорез, методы на основе протеомики, такие как идентификация индивидуальных белков, выделенных из геля (например, с помощью масс-спектрометрии или N-концевого секвенирования), и/или методы биоинформатики.

Методы выявления или измерения экспрессии белка могут необязательно осуществляться в форматах, которые допускают быстрое получение, обработку и анализ множественных образцов. Это могут быть, например, многолуночные планшеты для анализа (например, 96-луночные или 386-луночные) или матрицы (например, белковые чипы). Маточные растворы для различных реагентов могут быть предоставлены вручную или с помощью робота, и последующие получение образца, пипетирование, разбавление, смешивание, распределение, промывка, инкубация (например, гибридизация), считывание образца, сбор данных (оптических данных) и/или анализ (компьютерный анализ изображений) могут быть сделаны с помощью робота с использованием коммерчески доступного программного обеспечения для анализа, робототехники и приборов обнаружения, способных обнаруживать сигнал, генерируемый с помощью анализа. Примеры таких детекторов включают, но не ограничиваются этим, спектрофотометры, люминометры, флуориметры и устройства, измеряющие радиоизотопный распад. Иллюстративные высокоскоростные анализы на основе клеточных систем (например, обнаружение присутствия или уровня белка-мишени в клетке) могут использовать ArrayScan® VTI HCS Reader или технологию KineticScan® HCS Reader (Cellomics Inc., Cellomics Inc.,Pittsburg, PA).

Методы определения активности vWF также известны в данной области техники и описаны в настоящем документе (например, в

рабочих примерах). Смотри также, например, Horvath et al. (2004) Exp Clin Cardiol 9(10):31-34. Доступны также коммерческие наборы - Instrumentation Laboratory (Bedford, MA; каталожный номер: 0020004700) и Quest Diagnostics (Madison, NJ).

В некоторых вариантах осуществления могут быть оценены и/или измерены уровни экспрессии (или активности) белков, по меньшей мере, двух белковых биомаркеров aHUS (например, по меньшей мере, трех белков, по меньшей мере, четырех белков, по меньшей мере, пяти белков, по меньшей мере, шести белков, по меньшей мере, семи белков, по меньшей мере, восьми белков, по меньшей мере, девяти белков, по меньшей мере, 10 белков, по меньшей мере, 11 белков, по меньшей мере, 12 белков, по меньшей мере, 13 белков, по меньшей мере, 14 белков, по меньшей мере, 15 белков, по меньшей мере, 16 белков, по меньшей мере, 17 белков, по меньшей мере, 18 белков, по меньшей мере, 19 белков, по меньшей мере, 20 белков, по меньшей мере, 21 белка, по меньшей мере, 22 белков, по меньшей мере, 23 белков или, по меньшей мере, 24 белков или более).

В некоторых вариантах осуществления биологическая жидкость, в которой измеряют белковые биомаркеры aHUS, представляет собой кровь. В некоторых вариантах осуществления биологическая жидкость представляет собой фракцию крови, например, сыворотку или плазму. В некоторых вариантах осуществления биологическая жидкость представляет собой мочу. В некоторых вариантах осуществления все измерения выполняются в образце одной биологической жидкости (например, в образце сыворотки). В некоторых вариантах осуществления измерения выполняются, по меньшей мере, в двух различных биологических жидкостях, полученных от индивидуума. Например, в некоторых вариантах осуществления концентрация или активность одного или нескольких белковых биомаркеров aHUS измеряется в образце сыворотки, полученной от больного. В некоторых вариантах осуществления образец крови и образец мочи доступны в таком виде, чтобы обеспечить возможность тестирования различных анализируемых веществ на двух различных матрицах образцов.

Индивидуум может представлять собой, например, человека, страдающего aHUS, подозреваемого на его наличие, или находящегося в состоянии риска его развития. Индивидуум может представлять собой индивидуума, которого лечили (или в настоящее время лечат) ингибитором комплемента (например, ингибитором компонента C5 комплемента, таким как антитело против C5). Лечение может осуществляться менее одного месяца (например, менее 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 дня) до получения образца от индивидуума.

Способ может дополнительно включать стадию определения того, страдает ли индивидуум aHUS или подвержен риску его развития. Когда индивидуума лечили или лечат ингибитором комплемента (например, антителом против C5) по заранее определенной схеме дозирования, способ может дополнительно включать определение того, реагирует ли больной (терапевтически) на лечение ингибитором комплемента.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов способ требует записи измеренного(ых) значения(ний) концентрации, по меньшей мере, одного белкового биомаркера aHUS. Осуществление записи может происходить в письменной форме или на компьютерном носителе. Способ также может включать сообщение измеренного(ых) значения(ий) концентрации, по меньшей мере, одного белкового биомаркера aHUS, индивидууму и/или практикующему врачу, на попечении которого находится индивидуум.

В некоторых вариантах осуществления любой из способов, описанных в настоящем документе, может включать стадию введения индивидууму ингибитора комплемента в более высокой дозе или с повышенной частотой дозирования по отношению к предварительно определенной схеме дозирования, если индивидуум не реагирует на лечение ингибитором по предварительно заданной схеме дозирования.

Некоторые из описанных в настоящем документе способов включают сравнение измеренной концентрации или активности белкового биомаркера aHUS (при измерении в биологическом

образце, полученном от индивидуума) с контрольным образцом. В некоторых вариантах осуществления контрольный образец получают от индивидуума до введения индивидууму ингибитора комплемента (например, ингибитора C5, такого как экулизумаб). В некоторых вариантах осуществления контрольный образец может представлять собой (или может быть основан), например, на коллекции образцов, полученных от одного или более (например, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40, или более) здоровых индивидуумов, которым не вводили ингибитор комплемента. В некоторых вариантах осуществления контрольный образец может представлять собой (или может быть основан), например, на объединенном образце, полученном от двух или более (например, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, 10, 15, 20, 25, 30, 35, или 40 или более) индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, объединенные образцы могут быть от здоровых индивидуумов, или, по меньшей мере, от индивидуумов, которые не страдают aHUS или не подозреваются ни на его наличие (ни на риск его развития). Например, определение того, является ли индивидуум индивидуумом, страдающим aHUS, может включать измерение концентрации одного или более биомаркеров в сыворотке индивидуума и сравнение измеренной концентрации со средней концентрацией тех же маркеров в пуле образцов от здоровых индивидуумов. Аналогичным образом, определение того, является ли концентрация или активность биомаркера, связанного с aHUS, сниженной после лечения ингибитором комплемента, может включать сравнение концентрации или активности белка в биологической жидкости, полученной от индивидуума до начала лечения ингибитором комплемента, с концентрацией белка в образце той же биологической жидкости, полученной от больного после лечения ингибитором (например, через один день, два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, месяц, 6 недель, два месяца, три месяца после лечения ингибитором (например, после первой из серий лечения при хронической терапии)).

В некоторых вариантах осуществления определение того,

вызывает ли ингибитор комплемента желаемый эффект (например, снижение концентрации или активности белкового биомаркера aHUS) у человека, может быть осуществлено с помощью выяснения того, падает ли после лечения концентрация белка в пределах заданного диапазона, указывающего на реакцию человека на ингибитор комплемента. В некоторых вариантах осуществления определение того, вызывает ли ингибитор комплемента желаемый эффект у человека, может включать выяснение того, падает ли после лечения концентрация или активность одного или более белковых биомаркеров aHUS больше или меньше предварительно определенной величины отсечения. Величина отсечения обычно представляет собой концентрацию или активность данного белка в данной биологической жидкости, уровень выше или ниже которой, считается показателем определенного фенотипа – например, чувствительности к терапии с ингибитором комплемента.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, тот же практикующий специалист может вводить ингибитор комплемента индивидууму перед определением того, произошло ли изменение концентрации или активности одного или более белковых биомаркеров aHUS, тогда как в некоторых вариантах осуществления практикующий специалист, который вводит ингибитор индивидууму, отличается от практикующего специалиста, который определяет, произошла ли ответная реакция у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления практикующий специалист может получить биологический образец (например, образец крови) от индивидуума перед введением ингибитора. В некоторых вариантах осуществления практикующий специалист может получить биологический образец (например, образец крови) от индивидуума после введения ингибитора индивидууму. В некоторых вариантах осуществления образец после лечения может быть получен от индивидуума менее чем через 48 (например, менее чем через 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, девять, восемь, семь, шесть, пять, четыре, три, два, или даже менее чем через один) час после введения ингибитора

индивидууму. В некоторых вариантах осуществления образец после лечения может быть получен от индивидуума менее чем через 20 (например, менее чем через 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, девять, восемь, семь, шесть, пять, четыре, три, два или один) день (дни) после введения ингибитора индивидууму. В некоторых вариантах осуществления биологический образец получают от индивидуума не более чем через 20 (например, не более чем 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, девять, восемь, семь, шесть, пять, четыре, три, два или один) день (дни) после введения ингибитора индивидууму.

В некоторых вариантах осуществления различные стадии способов, описанных в настоящем документе, могут быть выполнены более чем одним практикующим специалистом. Например, один практикующий специалист может анализировать (например, измерять концентрацию или активность одного или более белковых биомаркеров aHUS) в образцах до и после лечения, полученных от индивидуума. Другой практикующий специалист может получать информацию относительно анализа образцов от первого практикующего специалиста, чтобы таким образом определить, реагирует ли, например, индивидуум на лечение ингибитором комплемента. В некоторых вариантах осуществления еще один специалист может получать биологический образец от больного перед лечением, и четвертый специалист может получать биологический образец от индивидуума после лечения. В некоторых вариантах осуществления все стадии выполняются одним и тем же практикующим специалистом.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБРАЗЦЫ И СБОР ОБРАЗЦОВ

Подходящие биологические образцы для использования в способах, описанных в настоящем документе, включают, например, любую биологическую жидкость. Биологический образец может представлять собой, например, образец, полученный от индивидуума (например, млекопитающего, такого как человек) или может происходить от такого индивидуума. Биологический образец может также представлять собой биологическую жидкость, такую как моча, цельная кровь или ее фракция (например, плазма или сыворотка), слюна, сперма, мокрота, цереброспинальная жидкость,

слезы или слизь. Биологический образец может быть дополнительно разделен, если это желательно, на фракции, содержащие конкретные анализируемые вещества (например, белки), представляющие интерес. Например, образец цельной крови может быть фракционирован на сыворотку или на фракции, содержащие определенные типы белков. Если это желательно, биологический образец может представлять собой сочетание различных биологических образцов от индивидуума, такое как сочетание двух различных жидкостей.

Биологические образцы, пригодные для настоящего изобретения, могут представлять собой свежие или замороженные образцы, собранные у индивидуума, или архивные образцы с известным диагнозом, историей лечения и/или исхода. Биологические образцы могут быть получены от индивидуума, например, от индивидуума, страдающего нарушением, связанным с комплементом, таким как aHUS, подозреваемого на его наличие, или находящегося в состоянии риска его развития. Могут быть использованы любые подходящие способы получения биологических образцов, хотя иллюстративные способы включают, например, флеботомию, мазок (например, щечный мазок), лаваж или метод биопсии с помощью тонкоигольной аспирации. Биологические образцы могут быть получены из костного мозга.

В некоторых вариантах осуществления из биологического образца может быть получен белковый экстракт. В некоторых вариантах осуществления белковый экстракт содержит суммарное количество белка. Методы экстракции белка хорошо известны в данной области техники. Смотри, например, Roe (2001) «Protein Purification Techniques: A Practical Approach», 2nd Edition, Oxford University Press. Многочисленные, разнообразные и многофункциональные наборы могут быть использованы для экстракции белков из жидкостей и тканей организма, и они коммерчески доступны, например, от BioRad Laboratories (Hercules, CA), BD Biosciences Clontech (Mountain View, CA), Chemicon International, Inc. (Temecula, CA), Calbiochem (San Diego, CA), Pierce Biotechnology (Rockford, IL) и Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA).

Способы получения и/или хранения образцов, которые сохраняют активность или целостность клеток в биологическом образце, хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, биологический образец может быть дополнительно введен в контакт с одним или более дополнительными агентами, такими как подходящие буферы и/или ингибиторы, включая ингибиторы протеаз, агенты, предназначенные для консервации или минимизации изменений (например, изменений осмолярности или pH) структуры белка. Такие ингибиторы включают, например, хелаторы, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), этиленгликольтетрауксусная кислота (EGTA), ингибиторы протеаз, такие как фенилметилсульфонилфторид (PMSF), апротинин и лейпептин. Подходящие буферы и условия хранения или иная обработка целых клеток, описаны, например, в Pollard and Walker (1997), «Basic Cell Culture Protocols,» volume 75 of Methods in molecular biology, Humana Press; Masters (2000) «Animal cell culture: a practical approach,» volume 232 of Practical approach series, Oxford University Press; and Jones (1996) «Human cell culture protocols,» volume 2 of Methods in molecular medicine, Humana Press.

Образец также может быть обработан для устранения или сведения к минимуму присутствия мешающих веществ. Например, биологический образец может быть фракционирован или очищен для удаления одного или более материалов (например, клеток), которые не представляют интерес. Методы фракционирования или очистки биологического образца включают, но не ограничиваются этим, проточную цитометрию, сортировку клеток с активацией флуоресценции и седиментацию.

ИНГИБИТОРЫ КОМПЛЕМЕНТА

Любое соединение, которое связывается с любым из компонентов комплемента человека и ингибирует его или иным образом ингибирует его продукцию и/или активность, может быть использовано в соответствии с настоящим изобретением. Например, ингибитор комплемента может представлять собой, например, небольшую молекулу, нуклеиновую кислоту или аналог нуклеиновой кислоты, пептидомиметик или макромолекулу, которая не является

нуклеиновой кислотой или белком. Эти агенты включают, но не ограничиваются этим, небольшие органические молекулы, РНК-аптамеры, L-РНК-аптамеры, шпигельмеры, антисмысловые соединения, двухцепочечную РНК, небольшую интерферирующую РНК, ингибиторы блокированных нуклеиновых кислот и ингибиторы пептидных нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления ингибитор комплемента может представлять собой белок или белковый фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления композиции содержат антитела, специфичные по отношению к компоненту комплемента человека. Некоторые соединения включают антитела, направленные против компонентов комплемента C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, фактора D, фактора В, фактора Р, MBL, MASP-1, MASP-2, пропердина или биологически активных фрагментов любого из представленных выше, таким образом предотвращая генерацию анафилактической активности, связанной с C5a и/или предотвращая сборку мембраноатакующего комплекса C5b-9.

Композиции могут также содержать природные или растворимые формы соединений, ингибирующих комплемент, такие как CR1, LEX-CR1, MCP, DAF, CD59, фактор H, фактор яда кобры, FUT-175, комплестатин и K76 COOH. Другие соединения, которые могут быть использованы для связывания или блокирования иным образом генерации и/или активности любого из компонентов комплемента человека, включают, но не ограничиваются этим, белки, белковые фрагменты, пептиды, небольшие молекулы, РНК-аптамеры, включая ARC187 (который коммерчески доступен от Archemix Corporation, Cambridge, MA), L-РНК-аптамеры, шпигельмеры, антисмысловые соединения, ингибиторы сериновых протеаз, молекулы, которые могут быть использованы в РНК-интерференции (RNAi), такие как двухцепочечная РНК, включая малую интерферирующую РНК (siRNA), ингибиторы блокированных нуклеиновых кислот (LNA), ингибиторы пептидных нуклеиновых кислот (PNA) и т.д.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор комплемента ингибирует активацию комплемента. Например, ингибитор комплемента может связываться с C1 (например, C1q, C1r или C1s) и ингибировать их активность в отношении активации комплемента,

или ингибитор комплемента может связываться с C2, C3 или C4 и их ингибировать (например, ингибировать их расщепление). В некоторых вариантах осуществления ингибитор ингибирует образование или сборку C3 конвертазы и/или C5 конвертазы альтернативного и/или классического путей комплемента. В некоторых вариантах осуществления ингибитор комплемента ингибирует образование терминального комплемента, например, формирование мембраноатакующего комплекса C5b-9. Например, антитело, ингибитор комплемента, может включать антитело против C5. Такие антитела против C5 могут прямо взаимодействовать с C5 и/или C5b, так, чтобы ингибировать образование и/или физиологическую функцию C5b.

В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем документе, могут содержать ингибитор компонента C5 комплемента человека (например, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с белковым компонентом C5 комплемента человека или его биологически активным фрагментом, таким как C5a или C5b). При применении в настоящем описании «ингибитор компонента C5 комплемента» представляет собой любой агент, который ингибирует: (i) экспрессию или надлежащий внутриклеточный трафик или секрецию клеткой белкового компонента C5 комплемента; (ii) активность фрагментов расщепления C5-C5a или C5b (например, связывание C5a с распознающими его клеточными рецепторами или связывание C5b с C6 и/или другими компонентами терминального комплекса комплемента; смотри выше); (iii) расщепление белка C5 человека с образованием C5a и C5b; (iv) надлежащий внутриклеточный трафик или секрецию клеткой белкового компонента C5 комплемента; или (v) стабильность белка C5 или мРНК, кодирующей белок C5. Ингибирование экспрессии белкового компонента C5 комплемента включает: ингибирование транскрипции гена, кодирующего белок C5 человека; повышение деградации мРНК, кодирующей белок C5 человека; ингибирование трансляции мРНК, кодирующей белок C5 человека; повышение деградации белка C5 человека; ингибирование надлежащего процессинга препробелка C5 человека; или ингибирование надлежащего трафика или секреции

клеткой белка C5 человека. Способы определения того, является ли кандидатный агент ингибитором компонента C5 комплемента человека, известны в данной области техники и описаны в данном документе.

Ингибитор компонента C5 комплемента человека может представлять собой, например, небольшую молекулу, полипептид, аналог полипептида, нуклеиновую кислоту или аналог нуклеиновой кислоты.

Термин «небольшая молекула», используемый в настоящем документе, предназначен для обозначения агента, который имеет молекулярную массу предпочтительно менее приблизительно 6 кДа и наиболее предпочтительно менее приблизительно 2,5 кДа. Многие фармацевтические компании имеют большие библиотеки химических и/или биологических смесей, включающих набор небольших молекул, часто грибковых, бактериальных экстрактов или экстрактов водорослей, которые могут быть подвергнуты скринингу на применение с помощью любого из тестов. Это применение охватывает использование, среди прочего, небольших химических библиотек, пептидных библиотек или коллекций натуральных продуктов. Tan et al. описали библиотеку с более чем двумя миллионами синтетических соединений, которые совместимы с миниатюризированными анализами на основе клеточных систем (J Am Chem Soc (1998) 120:8565-8566). В объеме настоящей заявки рассматривается, что такая библиотека может быть использована для скрининга агентов, которые связываются с антигеном-мишенью, представляющим интерес (например, компонентом C5 комплемента). Существуют многочисленные коммерчески доступные библиотеки соединений, такие как ChemBridge DIVERSet. Библиотеки, такие как набор Diversity программы терапевтических разработок NCI, также доступны от академических исследователей. Также может быть использован рациональный дизайн лекарств. Например, в рациональном дизайне лекарств можно задействовать использование структурной информации о кристаллической структуре белкового компонента C5 комплемента человека или его структуре в растворе. См. например, структуры, описанные в Hagemann et al. (2008) J Biol Chem 283(12):7763-75 и Zuiderweg et al.

(1989) Biochemistry 28(1):172-85. Рациональный дизайн лекарств может быть также достигнут на основе известных соединений, например, известного ингибитора C5 (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который связывается с белковым компонентом C5 комплемента человека).

Пептидомиметики могут представлять собой соединения, в которых, по меньшей мере, часть исследуемого полипептида модифицирована, и трехмерная структура пептидомиметика остается по существу такой же, что и у исследуемого полипептида. Пептидомиметики могут представлять собой аналоги исследуемого полипептида по изобретению, которые сами по себе представляют собой полипептиды, содержащие одну или более замен или других модификаций в пределах последовательности исследуемого полипептида. Альтернативно, по меньшей мере, часть исследуемой полипептидной последовательности может быть заменена непептидной структурой таким образом, что трехмерная структура исследуемого полипептида по существу сохраняется. Другими словами, один, два или три аминокислотных остатка в пределах исследуемой полипептидной последовательности могут быть заменены непептидной структурой. Кроме того, другие пептидные части исследуемого полипептида могут, но не обязательно, быть заменены непептидной структурой. Пептидомиметики (как пептидные, так и непептидные аналоги) могут иметь улучшенные свойства (например, пониженный протеолиз, повышенную сохранность или повышенную биодоступность). Пептидомиметики обычно улучшают пероральную доступность, что делает их особенно подходящими для лечения заболеваний у человека или животного. Следует отметить, что пептидомиметики могут иметь или могут не иметь сходные двухмерные химические структуры, но имеют общие трехмерные структурные особенности и геометрию. Каждый пептидомиметик может дополнительно иметь один или более уникальных дополнительных связывающих элементов.

Ингибиторы нуклеиновых кислот могут быть использованы для связывания и ингибирования антигена-мишени, представляющего интерес. Антагонист нуклеиновой кислоты может представлять собой, например, аптамер. Аптамеры представляют собой короткие

олигонуклеотидные последовательности, которые могут быть использованы для распознавания и специфического связывания почти любой молекулы, включая белки клеточной поверхности. Процесс систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX) обладает широкими возможностями и может быть использован для легкой идентификации таких аптамеров. Аптамеры могут быть получены для широкого диапазона белков, имеющих значение для терапии и диагностики, таких как факторы роста и антигены клеточной поверхности. Эти олигонуклеотиды связываются со своими мишенями со сходным с антителами сродством и специфичностью (смотри, например, Ulrich (2006) *Handb Exp Pharmacol*. 173:305-326).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор комплемента представляет собой белок каркаса, не являющийся антителом. Эти белки обычно получают с помощью комбинаторной химии на основе адаптации предсуществующих антигенсвязывающих белков. Например, сайт связывания трансферрина человека рецептора трансферрина человека может быть модифицирован с помощью комбинаторной химии с созданием разнообразной библиотеки вариантов трансферрина, некоторые из которых приобретают сродство к различным антигенам. Ali et al. (1999) *J Biol Chem* 274:24066-24073. Часть трансферрина человека, не вовлеченная в связывание с рецептором, остается неизменной и служит в качестве каркаса подобно каркасным областям антител для презентации вариантов сайтов связывания. Библиотеки затем подвергают скринингу в качестве библиотеки антител против антигена-мишени, представляющего интерес, для идентификации тех вариантов, которые имеют оптимальные селективность и сродство к антигену-мишени. Белки каркаса, не являющиеся антителами и в то время сходные по функциям к антителам, рекламируются как имеющие ряд преимуществ по сравнению с антителами, причем преимущества включают, среди прочего, повышенные растворимость и проникновение в ткани, менее дорогостоящее получение и простоту конъюгации с другими молекулами, представляющими интерес. Neu et al. (2005) *TRENDS Biotechnol* 23(10):514-522.

Специалисту в данной области техники должно быть понятно,

что каркасная часть белков каркаса, не являющихся антителами, может включать, например, все или часть из: Z домена протеина A *S. aureus*, трансферрина человека, десятого домена фибронектина типа III человека, домен Куница ингибитора трипсина человека, CTLA-4 человека, белка с анкириновыми повторами, липокалина человека, кристаллина человека, убиквитина человека или ингибитора трипсина из *E. elaterium*. Id.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор комплемента представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с белковым компонентом C5 комплемента человека. (В настоящем документе далее антитело может иногда обозначаться как «антитело против C5»).

В некоторых вариантах осуществления антитело против C5 может связываться с эпитопом в альфа-цепи белкового компонента C5 комплемента человека. Антитела, которые связываются с альфа-цепью C5, описаны, например, в опубликованной заявке РСТ no. WO 2010/015608 и в патенте США no. 6355245. В некоторых вариантах осуществления антитело против C5 может связываться с эпитопом в бета-цепи белкового компонента C5 комплемента человека. Антитела, которые связываются с бета-цепью C5, описаны, например, Moongkarndi et al. (1982) *Immunobiol* 162:397; Moongkarndi et al. (1983) *Immunobiol* 165:323; and Mollnes et al. (1988) *Scand J Immunol* 28:307-312.

Дополнительные иллюстративные антигенные фрагменты компонента C5 комплемента человека раскрыты, например, в патенте США no. 6355245, раскрытие которого включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Дополнительные антитела против C5, и их антигенсвязывающие фрагменты, пригодные для использования в гибридных белках, описанные в настоящем документе, описаны, например, в опубликованной заявке РСТ no. WO 2010/015608, раскрытие которой включено в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления антитело против C5 специфически связывается с белковым компонентом C5 комплемента человека (например, с белком C5 человека, имеющим

аминокислотную последовательность, изображенную в SEQ ID NO:1). Термины «специфическое связывание» или «специфически связывается» относятся к двум молекулам, образующим комплекс (например, комплекс между антителом и белковым компонентом C5 комплемента), который является относительно стабильным при физиологических условиях. Обычно связывание считается специфическим, когда константа ассоциации (K_a) выше 10^6 M^{-1} . Таким образом, антитело может специфически связываться с белком C5 с K_a , по меньшей мере, (или выше) 10^6 (например, по меньшей мере, или выше 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} или 10^{15} или выше) M^{-1} . Примеры антител, которые специфически связываются с белковым компонентом C5 комплемента человека, описаны, например, в патенте США No. 6355245, раскрытие которого включено в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

Антитела против C5, описанные в настоящем документе, могут обладать активностью в отношении блокирования генерации или активности активных фрагментов белкового компонента C5 комплемента C5a и/или C5b (например, белка C5 человека). Благодаря этому блокирующему эффекту, антитела против C5 ингибируют, например, провоспалительные эффекты C5a и генерацию C5b-9 мембраноатакующего комплекса (MAC) на поверхности клетки. Антитела против C5, которые обладают способностью блокировать генерацию C5a, описаны, например, Moongkarndi et al. (1982) Immunobiol 162:397 и Moongkarndi et al. (1983) Immunobiol 165:323.

В некоторых вариантах осуществления антитело против C5 или его антигенсвязывающий фрагмент может снижать способность белка C5 связываться с компонентом C3b комплемента человека (например, с C3b, присутствующим в AP или в CP комплексе конвертазы C5) более чем на 50 (например, более чем на 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 или более) %. В некоторых вариантах осуществления после связывания с белком C5 антитело против C5 или его антигенсвязывающий фрагмент может снижать способность белка C5 связываться с компонентом C4b комплемента (например, с C4b, присутствующим в CP конвертазы C5) более чем

на 50 (например, более чем на 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 или более) %. Методы определения того, может ли антитело блокировать генерацию или активность активных фрагментов C5a и/или C5b белкового компонента C5 комплемента или связываться с компонентами C4b или C3b комплемента, известны в данной области и описаны, например, в патенте США No. 6355245 и Wurznner et al. (1991) Complement Inflamm 8:328-340.

В некоторых вариантах осуществления композиция включает экулизумаб и/или антитело представляет собой экулизумаб (Soliris®; Alexion Pharmaceuticals, Inc., Cheshire, CT). (Смотри, например, Kaplan (2002) Curr Opin Investig Drugs 3(7):1017-23; Hill (2005) Clin Adv Hematol Oncol 3(11):849-50; и Rother et al. (2007) Nature Biotechnology 25(11):1256-1488.) В некоторых вариантах осуществления композиция включает пекселезумаб и/или антитело представляет собой пекселезумаб (Alexion Pharmaceuticals, Inc., Cheshire, CT). (Смотри, например, Whiss (2002) Curr Opin Investig Drugs 3(6):870-7; Patel et al. (2005) Drugs Today (Barc) 41(3):165-70; и Thomas et al. (1996) Mol Immunol 33(17-18):1389-401.)

В некоторых вариантах осуществления ингибитор C5 представляет собой антитело, которое связывается с C5a (иногда обозначаемое в настоящем документе как «антитело против C5a»). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с C5a, но не с полноразмерным C5. В некоторых вариантах осуществления связывание антитела с C5a может ингибировать биологическую активность C5a. Методы измерения активности C5a включают, например, тестирование хемотаксиса, RIAs или ELISAs (смотри, например, Ward and Zvaifler (1971) J Clin Invest 50(3):606-16 и Wurznner et al. (1991) Complement Inflamm 8:328-340). В некоторых вариантах осуществления связывание антитела с C5a может ингибировать взаимодействие между C5a и C5aR1. Подходящие способы детектирования и/или измерения взаимодействия между C5a и C5aR1 (в присутствии и в отсутствие антитела) известны в данной области техники и описаны, например, Mary and Boulay (1993) Eur J Haematol 51(5):282-287; Kaneko et al. (1995) Immunology 86(1):149-154; Giannini et al. (1995) J Biol Chem

270(32):19166-19172; и в опубликованной заявке на патент США No.20060160726. Например, может быть оценено связывание C5a, меченного детектируемой меткой (например, радиоактивной меткой), с моноклеарными клетками периферической крови, экспрессирующими C5aR1, в присутствии и в отсутствие антитела. Снижение количества детектируемого меченного C5a, связанного с C5aR1 в присутствии антитела, по сравнению с количеством связанного в отсутствие антитела, является показателем того, что антитело ингибирует взаимодействие между C5a и C5aR1. В некоторых вариантах осуществления связывание антитела с C5a может ингибировать взаимодействие между C5a и C5L2 (смотри ниже). Методы детектирования и/или измерения взаимодействия C5a и C5L2 известны в данной области и описаны, например, Ward (2009) *J Mol Med* 87(4):375-378 и Chen et al. (2007) *Nature* 446(7132):203-207 (смотри ниже).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор C5 представляет собой антитело, которое связывается с C5b (иногда обозначаемое в настоящем документе как «антитело против C5b»). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с C5b, но не связывается с полноразмерным C5. Структура C5b описана, например, Müller-Eberhard (1985) *Biochem Soc Symp* 50:235-246; и Yamamoto and Gewurz (1978) *J Immunol* 120(6):2008-2015. Как описано выше, C5b соединяется с C6, C7 и C8 с образованием комплекса C5b-8 на поверхности клетки-мишени. Промежуточные продукты белкового комплекса, образующиеся в процессе серий взаимодействий включают C5b-6 (включая C5b и C6), C5b-7 (включая C5b, C6 и C7) и C5b-8 (включая C5b, C6, C7 и C8). После связывания нескольких молекул C9 образуется мембраноатакующий комплекс (MAC, C5b-9 терминального комплекса комплемента (TCC)). Когда достаточное количество MACs встраивается в мембраны клеток-мишеней, они формируют отверстия (поры MAC), опосредующие быстрый осмотический лизис клеток-мишеней.

В некоторых вариантах осуществления связывание антитела с C5b может ингибировать взаимодействие между C5b и C6. В некоторых вариантах осуществления связывание антитела с C5b

может ингибировать сборку или активность C5b-9 MAC-ТСС. В некоторых вариантах осуществления связывание антитела с C5b может ингибировать лизис клеток, зависимый от комплемента (например, *in vitro* и/или *in vivo*). Подходящие методы оценки того, ингибирует ли антитело зависимый от комплемента лизис, включают, например, гемолитические анализы или другие функциональные анализы для определения активности растворимого C5b-9. Например, снижение способности комплемента к лизису клеток в присутствии антитела может быть измерено с помощью анализа гемолиза, описанного Kabat and Mayer (eds.), «Experimental Immunochimistry, 2nd Edition,» 135-240, Springfield, IL, CC Thomas (1961), pages 135-139, или обычного варианта этого анализа, такого как метод гемолиза эритроцитов цыплят, как описано, например, в статье Hillmen et al. (2004) *N Engl J Med* 350(6):552.

Антитела, которые связываются с C5b, а также способы получения таких антител известны в данной области техники. Коммерчески доступные антитела против C5b доступны от ряда поставщиков, включая, например, Hycult Biotechnology (каталожный номер: HM2080; клон 568) и Abcam™ (ab46151 или ab46168).

Методы определения того, является ли определенный агент ингибитором компонента C5 комплемента человека, описаны в настоящем документе и известны в данной области техники. Например, концентрация и/или физиологическая активность C5a и C5b в жидкости организма может быть измерена с помощью методов, хорошо известных в данной области техники. Методы измерения концентрации или активности C5a включают, например, методы хемотаксиса, RIAs или ELISAs (смотри, например, Ward and Zvaifler (1971) *J Clin Invest.* 50(3):606-16 и Wurznier et al. (1991) *Complement Inflamm.* 8:328-340). Для C5b могут быть использованы гемолитические анализы или анализы на растворимый C5b-9, как описано в настоящем документе. Могут быть использованы также другие анализы, известные в данной области техники. При использовании анализов этих или других подходящих типов может быть проведен скрининг кандидатных агентов,

способных ингибировать компонент C5 комплемента человека, таких как антитело против C5, для того чтобы, например, идентифицировать соединения, которые пригодны для способов, описанных в настоящем документе, и определить подходящие уровни дозирования таких соединений.

Методы определения того, ингибирует ли кандидатное соединение расщепление C5 человека в формы C5a и C5b известны в данной области техники и описаны, например, Moongkarndi et al. (1982) *Immunobiol* 162:397; Moongkarndi et al. (1983) *Immunobiol* 165:323; Isenman et al. (1980) *J Immunol* 124(1):326-31; Thomas et al. (1996) *Mol. Immunol* 33(17-18):1389-401; и Evans et al. (1995) *Mol. Immunol* 32(16):1183-95.

Ингибирование компонента C5 комплемента человека может также снизить способность комплемента лизировать клетки в жидкостях организма данного индивидуума. Такое наличие снижения способности комплемента лизировать клетки может быть измерено с помощью методов, хорошо известных в данной области техники, таких как, например, обычный гемолитический анализ, такой как анализ гемолиза, описанный Kabat and Mayer (eds), «*Experimental Immunochimistry*, 2nd Edition,» 135-240, Springfield, IL, CC Thomas (1961), pages 135-139, или обычный вариант этого анализа, такой как метод гемолиза эритроцитов цыплят, как описано, например, Hillmen et al. (2004) *N Engl J Med* 350(6):552.

Антитела, которые связываются с C3b, и, например, ингибируют конвертазу C3b, также хорошо известны в данной области техники. Смотри, например, опубликованные заявки PCT. nos. WO 2010/136311, WO 2009/056631 и WO 2008/154251, раскрытие каждой из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме. Антагонистические антитела против C6 и против C7 описаны, например, Brauer et al. (1996) *Transplantation* 61(4):588-594 и в патенте США no. 5679345.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело против фактора В (например, моноклональное антитело 1379, продуцируемое депозитом ATCC No. PTA-6230). Антитела против фактора В также описаны, например, Ueda et al.

(1987) J Immunol 138(4):1143-9; Tanhehco et al. (1999) Transplant Proc 31(5):2168-71; в патентах США nos. 7999082 и 7964705; и в публикации РСТ no. WO 09/029669.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело против фактора D, например, антитело, описанное Pascual et al. (1990) J Immunol Methods 127:263-269; Sahu et al. (1993) Mol Immunol 30(7):679-684; Pascual et al. (1993) Eur J Immunol 23:1389-1392; Niemann et al. (1984) J Immunol 132(2):809-815; в патенте США no. 7439331; или в опубликованной патентной заявке США no. 20080118506.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело против пропердина. Подходящие антитела против пропердина также хорошо известны в данной области техники и включают, например, описанные в опубликованной патентной заявке США nos. 20110014614 и опубликованной заявке РСТ no. WO2009110918.

МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ

В настоящем документе предлагаются также композиции и способы лечения или профилактики аНУС у индивидуума (например, человека). Композиции (например, ингибиторы комплемента и/или вторичные агенты) могут быть введены индивидууму, например, индивидууму-человеку, с использованием различных методов, которые зависят в частности от способа введения. Способ введения может представлять собой, например, внутривенную (в/в) инъекцию или инфузию, подкожную (п/к) инъекцию, внутрибрюшинную (в/б) инъекцию или внутримышечную инъекцию.

Введение может быть достигнуто путем, например, местной инфузии, инъекции или с помощью имплантата. Имплантат может представлять собой пористый, непористый или желатиновый материал, включая мембраны, такие как силикатные мембраны или волокна. Имплантат может быть сконфигурирован для постоянного или периодического высвобождения композиции в организм индивидуума. См. например, патентную публикацию США no. 20080241223; патенты США nos. 5501856; 4863457; и 3710795; и европейские патенты nos. EP488401 и EP430539, раскрытие каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки в

полном объеме. Композиция может быть доставлена индивидууму с помощью имплантируемого устройства, основанного, например, на диффузионных, разрушаемых или конвективных системах, например, осмотических насосах, биоразлагаемых имплантатах, системах электродиффузии, системах электроосмоса, паронагнетательных насосах, электролитических насосах, шипучих насосах, пьезоэлектрических насосах, системах на основе эрозии или электромеханических системах.

Подходящая доза ингибитора комплемента (например, антитела против C5 или его фрагмента), причем доза, способная лечить или предотвращать aHUS у индивидуума, может зависеть от различных факторов, включая, например, возраст, пол и вес индивидуума, подлежащего лечению, и конкретное, используемое ингибиторное соединение. Например, для лечения индивидуума с aHUS может потребоваться другая доза siRNA, специфичной для C5 человека по сравнению с дозой антитела против C5, требуемой для лечения того же больного. Другие факторы, влияющие на дозу, вводимую индивидууму, включают, например, тип или тяжесть aHUS. Например, индивидууму, страдающему aHUS, связанным с CFH, может потребоваться введение дозы ингибитора, отличной от дозы у индивидуума с aHUS, ассоциированным с MCP. Другие факторы могут включать, например, другие медицинские нарушения, одновременно или ранее возникшие у индивидуума, общее состояние здоровья индивидуума, генетическую предрасположенность индивидуума, диету, время введения, скорость выведения, сочетание лекарств, а также любые другие дополнительные терапевтические средства, которые вводят индивидууму. Кроме того, следует понимать, что конкретное дозирование и режим лечения любого конкретного индивидуума должен зависеть от мнения лечащего медицинского работника (например, врача или медсестры).

Ингибитор можно вводить в виде фиксированной дозы или в дозе миллиграмм на килограмм «мг/кг». В некоторых вариантах осуществления доза также может быть выбрана для снижения или избегания выработки антител или других иммунных ответов хозяина против одного или более активных агентов в композиции. Без ограничения каким-либо образом иллюстративные дозы ингибитора,

такого как антитело против C5, включают, например, 1-100 мг/кг, 0,5-50 мг/кг, 0,1-100 мг/кг, 0,5-25 мг/кг, 1-20 мг/кг и 1-10 мг/кг массы тела.

В некоторых вариантах осуществления человеку можно вводить внутривенно антитело против C5 (например, экулизумаб) в дозе приблизительно 900 мг приблизительно каждые 12 (например, приблизительно каждые 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 30, 42 или 49 или более) дней. Смотри, например, Hill et al. (2005) Blood 106(7):2559.

В некоторых вариантах осуществления человеку можно вводить внутривенно антитело против C5 (например, экулизумаб) в дозе приблизительно 600 (например, приблизительно 625, 650, 700, 725, 750, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950 или 1000 или более) мг каждую неделю, необязательно в течение двух или более (например, трех, четырех, пяти, шести, семи или восьми или более) недель. После первоначального лечения человеку можно вводить антитело в дозе приблизительно 900 мг приблизительно каждые 14 (например, приблизительно каждые 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 30, 42 или 49 или более) дней, например, в качестве поддерживающей дозы. Смотри, например, Hillmen et al. (2004) N Engl J Med. 350(6):552-9 и Dmytrijuk et al. (2008) The Oncologist 13(9):993.

В некоторых вариантах осуществления человеку можно вводить внутривенно антитело против C5 (например, экулизумаб) в дозе приблизительно 900 (например, 925, 950, 975, 1000, 1100 или 1200 или более) мг каждую неделю, необязательно в течение двух или более (например, трех, четырех, пяти, шести, семи или восьми или более) недель. После первоначального лечения человеку можно вводить антитело в дозе приблизительно 1200 мг приблизительно каждые 14 (например, приблизительно каждые 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 30, 42 или 49 или более) дней, например, в качестве поддерживающей дозы. Смотри, например, публикацию международной патентной заявки no. WO 2010/054403.

При использовании в настоящем документе «хронически введенный», «хроническое лечение», «лечить хронически» или

подобные им грамматические варианты относятся к режиму лечения, который используется для поддержания определенной пороговой концентрации терапевтического агента в крови больного с целью полностью или в значительной степени подавить системную активность комплемента у больного в течение длительного периода времени. Соответственно, больного, которого хронически лечат ингибитором комплемента, можно лечить в течение периода времени, который больше или равен 2 неделям (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 или 52 неделям; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцам, или 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5 или 12 лет или в течение оставшейся жизни больного) ингибитором в количестве и с частотой дозирования, которые достаточны для поддержания концентрации ингибитора в крови больного, которая ингибирует или существенно ингибирует системную активность комплемента у больного. В некоторых вариантах осуществления ингибитор комплемента можно хронически вводить больному, нуждающемуся в этом, в количестве и с частотой, которые эффективны для поддержания сывороточной гемолитической активности менее чем или равной 20 (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, или 5)%. Смотри, например, Hill et al. (2005) Blood 106(7):2559. В некоторых вариантах осуществления ингибитор комплемента может быть введен больному в количестве и с частотой, которые эффективны для поддержания уровней сывороточной лактатдегидрогеназы (LDH) в пределах, по меньшей мере, 20 (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5)% от нормального диапазона LDH. Смотри Hill et al. (2005) выше. В некоторых вариантах осуществления ингибитор комплемента вводят больному в количестве и с частотой, которые эффективны для поддержания уровня сывороточной LDH менее 550 (например, менее 540, 530, 520, 510, 500, 490, 480, 470, 460, 450, 440, 430, 420, 410, 400, 390, 380, 370, 360, 350, 340, 330, 320, 310, 300, 290, 280 или менее 270) мЕ/л. Для поддержания

системного ингибирования комплемента у больного ингибитор комплемента можно хронически вводить больному, например, один раз в неделю, один раз каждые две недели, два раза в неделю, один раз в день, один раз в месяц, или один раз каждые три недели.

Фармацевтическая композиция может включать терапевтически эффективное количество ингибитора компонента C5 комплемента человека (например, антитело против C5 или его антигенсвязывающий фрагмент). Такие эффективные количества могут быть легко определены специалистом с обычной квалификацией в данной области техники на основе, в частности, эффекта введенного ингибитора или сочетанного эффекта антитела и одного или более дополнительных активных агентов, если используется более одного агента. Терапевтически эффективное количество ингибитора компонента C5 комплемента человека (например, антитела против C5) может также варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и вес индивидуума, и способность антитела (и одного или более дополнительных активных агентов), вызывать желаемую реакцию у индивидуума, например, ослабление интенсивности, по меньшей мере, одного параметра состояния, например, ослабление, по меньшей мере, одного симптома aHUS. Например, терапевтически эффективное количество ингибитора компонента C5 комплемента (например, антитела против C5) может ингибировать (снижать тяжесть или устранять возникновение) и/или предотвращать тромбоцитопению, микроангиопатическую гемолитическую анемию, почечную недостаточность и/или любой один из симптомов aHUS, известных в данной области техники, или описанных в настоящем документе. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, при котором любые токсические или неблагоприятные эффекты композиции перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами.

Термины «терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» или подобные термины, используемые в настоящем документе, предназначены для обозначения количества агента (например, ингибитора компонента

5 комплемента человека), которое должно вызывать желаемую биологическую или медицинскую реакцию (например, улучшение одного или более симптомов aHUS). В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в настоящем документе, содержит терапевтически эффективное количество ингибитора компонента C5 комплемента человека. В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в настоящем документе, содержит терапевтически эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с белковым компонентом C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит два или более (например, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, 10 или 11 или более) различных ингибиторов компонента C5 комплемента человека, так что композиция в целом терапевтически эффективна. Например, композиция может содержать антитело, которое связывается с белком C5 человека и siRNA, которая связывается с мРНК, кодирующей белок C5 человека, и способствует ее деградации, где антитело и siRNA, каждое находятся в концентрации, которые при их объединении являются терапевтически эффективными. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит ингибитор и один или более вторых активных агентов, так что композиция в целом является терапевтически эффективной. Например, композиция может содержать антитело, которое связывается с белком C5 человека, и другой агент, пригодный для лечения или профилактики aHUS.

Токсичность и терапевтическая эффективность таких композиций может быть определена с помощью известных фармацевтических методов на клеточных культурах или на экспериментальных животных (животных моделях aHUS). Эти методы могут быть использованы, например, для определения LD₅₀ (летальной дозы для 50% популяции) и ED₅₀ (дозы, терапевтически эффективной у 50% популяции). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами представляет собой терапевтический индекс, и он может быть выражен как отношение LD₅₀/ED₅₀. Предпочтительными являются композиции или ингибиторы (например, антитела против C5) в композициях, которые имеют высокие

терапевтические индексы. Поскольку могут быть использованы композиции, которые обладают токсическими побочными эффектами, следует соблюдать осторожность при разработке системы доставки, которая направляет такие соединения к месту пораженной ткани и сводить к минимуму возможность повреждения нормальных клеток, и тем самым уменьшать побочные эффекты.

Данные, полученные из опытов на клеточных культурах и исследований на животных, могут быть использованы для определения диапазона доз для применения у людей. Подходящие животные модели aHUS известны в данной области техники и описаны, например, Atkinson et al. (2007) *Journal of Experimental Medicine* 204(6):1245-1248. Дозировка таких ингибиторов лежит обычно в пределах диапазона циркулирующих концентраций ингибиторов (например, антитела против C5 или его антигенсвязывающего фрагмента), которые включают ED₅₀ с небольшой токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и способа введения. Для ингибитора компонента C5 комплемента человека (например, антитела против C5), используемого как описано в настоящем документе (например, для лечения или профилактики aHUS), терапевтически эффективная доза может быть первоначально оценена из анализов на клеточных культурах. Доза может быть определена на животных моделях для достижения диапазона циркулирующих концентраций в плазме, который включает IC₅₀ (т.е. концентрацию тестируемого соединения, которая достигает половины максимального ингибирования симптомов), определенную в культуре клеток. Такая информация может быть использована для более точного определения пригодных доз у человека. Уровни в плазме могут быть измерены, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В некоторых вариантах осуществления необходимая доза ингибитора компонента C5 комплемента человека может быть определена на основании концентрации белка C5 человека в крови индивидуума. Например, индивидуум, имеющий более высокую концентрацию циркулирующих уровней белка C5 человека, может

требовать более высоких доз ингибитора C5 человека, чем индивидуум, имеющий более низкие уровни циркулирующего C5 человека. Методы определения концентрации компонента C5 комплемента человека в образце жидкости, происходящей из крови индивидуума, известны в данной области техники и описаны, например, Rawal et al. (1998) J Biol Chem 273(27):16828-16835.

В некоторых вариантах осуществления способы могут быть осуществлены в сочетании с другими видами лечения aHUS. Например, композиция может быть введена индивидууму одновременно, до или после нефрэктомии (например, двусторонней нефрэктомии), диализа, плазмафереза или инфузии плазмы (смотри, например, Noris et al. (2005) «Non-shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome.» In: Zipfel P (ed). Complement and Kidney Disease. Basel: Birkhauser-Verlag, 65-83).

При применении в настоящем документе «индивидуум» может представлять собой любое млекопитающее. Например, индивидуум может представлять собой человека, примата, не являющегося человеком (например, обезьяну, бабуина или шимпанзе), лошадь, корову, свинью, овцу, козу, собаку, кошку, кролика, морскую свинку, песчанку, хомяка, крысу или мышь. В некоторых вариантах осуществления индивидуумом является детеныш (например, ребенок человека).

При использовании в данном документе в отношении индивидуума «нуждающегося в предотвращении», «нуждающегося в лечении», или «нуждающегося в них», термины относятся к тому, кто по решению соответствующего медицинского работника (например, врача, медсестры или практикующей медсестры в случае человека; ветеринара в случае млекопитающих, не относящихся к человеку), должен объективно извлечь выгоду из данного лечения (например, лечения композицией, содержащей ингибитор компонента C5 комплемента человека).

При использовании в настоящем документе индивидуум «находящийся в состоянии риска развития aHUS» представляет собой индивидуума, имеющего один или более (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь или более) факторов риска развития заболевания. Факторы риска для aHUS хорошо известны в

данной области медицины и включают, например, предрасположенность к развитию состояния, т.е. семейную историю состояния или генетическую предрасположенность к развитию состояния, такую как, например, одна или более мутаций в факторе H комплемента (CFH), мембранном кофакторном белке (MCP; CD46), C4b-связывающем белке, факторе В комплемента (CFB), или факторе I комплемента (CFI). Смотри, например, Warwicker et al. (1998) *Kidney Int* 53:836-844; Richards et al. (2001) *Am J Hum Genet* 68:485-490; Caprioli et al. (2001) *Am Soc Nephrol* 12:297-307; Neuman et al. (2003) *J Med Genet* 40:676-681; Richards et al. (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 100:12966-12971; Fremeaux-Bacchi et al. (2005) *J Am Soc Nephrol* 17:2017-2025; Esparza-Gordillo et al. (2005) *Hum Mol Genet* 14:703-712; Goicoechea de Jorge et al. (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104(1):240-245; Blom et al. (2008) *J Immunol* 180(9):6385-91; и Fremeaux-Bacchi et al. (2004) *J Medical Genet* 41:e84). Смотри также Kavanagh et al. (2006), выше. Факторы риска также включают, например, инфицирование *Streptococcus pneumoniae*, беременность, рак, воздействие противораковых агентов (например, хинина, митомицина С, цисплатина или блеомицина), воздействие иммунотерапевтических агентов (например, циклоспорина, ОКТЗ или интерферона), воздействие антитромбоцитарных агентов (например, тиклопидина или клопидогрела), ВИЧ-инфекцию, трансплантацию, аутоиммунное заболевание и сочетанные метилмалоновую ацидурию и гомоцистинурию (cblC). Смотри, например, Constantinescu et al. (2004) *Am J Kidney Dis* 43:976-982; George (2003) *Curr Opin Hematol* 10:339-344; Gottschall et al. (1994) *Am J Hematol* 47:283-289; Valavaara et al. (1985) *Cancer* 55:47-50; Miralbell et al. (1996) *J Clin Oncol* 14:579-585; Dragon-Durey et al. (2005) *J Am Soc Nephrol* 16:555-63; and Becker et al. (2004) *Clin Infect Dis* 39:S267-S275. Таким образом, человек, находящийся в состоянии риска развития aHUS, может представлять собой, например, человека, который имеет семейную историю aHUS и/или человека, который страдает ВИЧ-инфекцией. Из вышеизложенного должно быть ясно, что индивидуумами, «находящимися в состоянии риска развития aHUS», являются не все

индивидуумы в пределах интересующих вариантов.

Индивидуум, «подозреваемый на наличие aHUS», представляет собой индивидуума, имеющего один или более симптомов заболевания. Симптомы этого заболевания хорошо известны специалистам в данной области медицины и включают, например, тяжелую гипертензию, протеинурию, уремию, вялость/усталость, раздражительность, тромбоцитопению, микроангиопатическую гемолитическую анемию и ухудшение почечной функции (например, острую почечную недостаточность). Из вышеприведенного текста должно быть ясно, что индивидуумами, «подозреваемыми на наличие aHUS», являются не все индивидуумы в пределах интересующих вариантов.

aHUS может быть генетическим, приобретенным или идиопатическим. aHUS можно рассматривать как генетический, когда два или более (например, три, четыре, пять, шесть или более) членов одной семьи страдают этой болезнью, по меньшей мере, шесть месяцев порознь, и исключается воздействие общего триггерного агента, или когда у индивидуума идентифицирована одна или более мутаций в генах, связанных с aHUS (например, одна или более мутаций в CFH, MCP/CD46, CFB или CFI). Например, индивидуум может страдать aHUS, связанным с CFH, aHUS, связанным с CFB, aHUS, связанным с CFI, или aHUS, связанным с MCP. До 30% генетического aHUS связано с мутациями в CFH, 12% с мутациями в MCP, 5-10% с мутациями в CFI и менее 2% с мутациями в CFB. Генетический aHUS может быть множественным (т.е., семейным; включающим двух или более болеющих членов семьи) или простым (т.е. с единственным случаем в семье). aHUS можно рассматривать как приобретенный, когда может быть идентифицирован лежащий в основе фактор окружающей среды (например, лекарство, системное заболевание или вирусные или бактериальные агенты, которые не приводят к шига-подобным экзотоксинам). aHUS можно рассматривать как идиопатический, когда не выявляется очевидного триггера (генетического или экологического).

В некоторых вариантах осуществления способы могут включать выявление индивидуума как индивидуума, страдающего aHUS,

подозреваемого на его наличие, или находящегося в состоянии риска его развития. В дополнение к использованию профиля биомаркеров aHUS, описанных в настоящем документе, могут быть выполнены лабораторные тесты для определения того, имеет ли человек тромбоцитопению, микроангиопатическую гемолитическую анемию или острую почечную недостаточность. Тромбоцитопения может быть диагностирована медицинским работником, как одно или более из: (i) количества тромбоцитов менее $150000/\text{мм}^3$ (например, менее $60000/\text{мм}^3$); (ii) снижения времени жизни тромбоцитов, которое снижается, отражая повышенное разрушение тромбоцитов в кровотоке; и (iii) выявления гигантских тромбоцитов в мазке периферической крови, что согласуется с вторичной активацией тромбоцитопоэза. Микроангиопатическая гемолитическая анемия может быть диагностирована медицинским работником, как одно или более из: (i) концентрации гемоглобина менее 10 мг/дл (например, менее 6,5 мг/дл); (ii) увеличения концентрации лактатдегидрогеназы (LDH) в сыворотке (>460 Ед/л); (iii) гипербилирубинемии, ретикулоцитоза, циркулирующего свободного гемоглобина и низких или недетектируемых концентрации гаптоглобина; и (iv) обнаружения фрагментированных эритроцитов (шизоцитов) с типичным видом клеток с шиловидными отростками или шлемовидных клеток в мазке периферической крови совместно с отрицательным тестом Кумбса. См. например, Kaplan et al. (1992) «Hemolytic Uremic Syndrome and Thrombotic Thrombocytopenic Purpura,» Informa Health Care (ISBN 0824786637) и Zipfel (2005) «Complement and Kidney Disease,» Springer (ISBN 3764371668).

Концентрации C3 и C4 в крови также могут быть использованы в качестве показателя активации или нарушения регуляции комплемента. Кроме того, состояние индивидуума может быть дополнительно охарактеризовано путем идентификации индивидуума как несущего одну или более мутаций в гене, связанном с aHUS, таким как CFI, CFB, CFH, или MCP (выше). Подходящие способы обнаружения мутации в гене, включают, например, секвенирование ДНК и методы матриц нуклеиновых кислот. См. например, Breslin et al. (2006) Clin Am Soc Nephrol 1:88-99 и Goicoechea

de Jorge et al. (2007) Proc Natl Acad Sci USA 104:240-245.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор компонента C5 комплемента человека (например, антитело против C5 или его антигенсвязывающий фрагмент) может быть введен индивидууму в виде монотерапии. Альтернативно, как описано выше, ингибитор можно вводить индивидууму в качестве комбинированной терапии с другим видом лечением, например, другим видом лечения aHUS. Например, комбинированная терапия может включать введение индивидууму (например, больному человеку) одного или более дополнительных агентов (например, антигипертензивных агентов), которые обеспечивают терапевтическое преимущество индивидууму, который страдает aHUS или находится в состоянии риска его развития. В некоторых вариантах осуществления ингибитор компонента C5 комплемента человека и один или более дополнительных активных агентов вводят одновременно. В других вариантах осуществления ингибитор вводят первым по времени и один или более дополнительных активных агентов вводят вторыми по времени. В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных активных агентов вводят первыми по времени и ингибитор вводят вторым по времени.

Ингибитор компонента C5 комплемента человека может заменить или дополнить лечение, проводимое ранее или в настоящее время. Например, при лечении антителом против C5 или его антигенсвязывающим фрагментом введение одного или более дополнительных активных агентов можно прекратить или уменьшить, например, их можно вводить на более низких уровнях. В некоторых вариантах осуществления введение предыдущих терапевтических агентов может быть сохранено. В некоторых вариантах осуществления предшествующее лечение будет поддерживаться до тех пор, пока уровень ингибитора C5 человека не достигнет уровня, достаточного для обеспечения терапевтического эффекта. Введение агентов двух типов лечения может происходить сочетано.

Мониторинг индивидуума (например, больного человека) в отношении улучшения aHUS, как определено в настоящем документе, обозначает обследование индивидуума на изменение параметра заболевания, например, на улучшение одного или более симптомов

заболевания. Такие симптомы включают любые из симптомов aHUS, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления обследование осуществляется, по меньшей мере, через 1 час, например, по меньшей мере, 2, 4, 6, 8, 12, 24 или 48 часов, или, по меньшей мере, 1 день, 2 дня, 4 дня, 10 дней, 13 дней, 20 дней или более, или, по меньшей мере, 1 неделю, 2 недели, 4 недели, 10 недель, 13 недель, 20 недель или более, после начала лечения. Индивидуум может быть обследован в один или более из следующих периодов: до начала лечения; во время лечения; или после введения одного или более элементов лечения. Обследование может включать оценку необходимости дальнейшего лечения, например, оценку того, следует ли изменить дозу, частоту введения или продолжительность лечения. Оно также может включать оценку необходимости добавления или отмены выбранного лечебного воздействия, например, добавления или отмены любого из типов лечения aHUS, описанных в настоящем документе.

НАБОРЫ

Предлагаются также наборы, включающие различные реагенты и вещества, используемые для выполнения способов, описанных в настоящем документе. Способы измерения, диагностики, обследования и/или оценки, описанные в настоящем документе, могут быть осуществлены диагностическими лабораториями, экспериментальными лабораториями или отдельными практикующими специалистами. В изобретении предлагаются наборы, которые могут быть использованы в любой или во всех из этих организаций.

В некоторых вариантах осуществления наборы, описанные в настоящем документе, включают вещества и реагенты, среди прочего, для характеристики или обработки биологических образцов (например, биологических жидкостей), измерения уровней биомаркеров (например, уровней белков или нуклеиновых кислот), диагностики aHUS у индивидуума, или мониторинга ответа на лечение у индивидуума в соответствии с методами, представленными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления набор по изобретению включает, по меньшей мере, один или более реагентов, которые специфически определяют уровни белка одного или более белковых биомаркеров aHUS

(например, биомаркеров, выбранных из таблицы 1) и, при необходимости, инструкции по использованию набора. Набор может включать, например, любую из матриц, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления наборы могут включать подходящие контрольные образцы (например, биологические жидкости от нормальных здоровых индивидуумов или раствор, включающий известное контрольное количество конкретного интересующего анализируемого вещества). В некоторых вариантах осуществления наборы по настоящему изобретению могут включать инструкции по использованию набора согласно одному или более методам, описанным в настоящем документе, и могут включать инструкции по обработке биологического образца (например, биологической жидкости), полученного от индивидуума, и/или по проведению теста или инструкции по интерпретации результатов.

Следующие примеры предназначены для иллюстрации, а не для ограничения изобретения.

ПРИМЕРЫ

Чтобы лучше понять патологию aHUS, изобретатели собрали образцы биологических жидкостей (цельной крови, сыворотки, плазмы и мочи) у больных, страдающих aHUS или подозреваемых на наличие aHUS, как до, так и в нескольких точках после начала лечения ингибитором комплемента (антителом экулизумабом против C5). Одной из целей данного исследования было определение серии клинически определяемых параметров, которые могут быть использованы для мониторинга реакции больных на лечение ингибитором комплемента, а также маркеров заболевания и его прогрессии или борьбы с ним. Изобретатели идентифицировали несколько белков, экспрессия и/или активность которых коррелировала либо с заболеванием aHUS и/или с реакцией больного aHUS на лечение ингибитором комплемента. Белки представляли собой белки, вовлеченные или связанные с комплементом и/или с активацией эндотелиальных клеток, воспалением, повреждением почек и свертыванием (смотри таблицу 1).

Для исследования были набраны в общей сложности 41

взрослый индивидуум (27 женщин и 12 мужчин) с подтвержденным диагнозом aHUS, а также нормальные здоровые взрослые добровольцы. Все больные страдали подтвержденным aHUS при скрининге на основе одной или более из следующих характеристик: количество тромбоцитов менее $150 \times 10^9/\text{л}$; уровни гемоглобина менее нижнего предела нормы; уровни LDH более или равны уровню, в 1,5 раза превышающему верхний предел нормы; уровни креатинина сыворотки более или равны верхнему пределу нормы; и уровень активности ADAMTS13 более 5%. Все больные при тестировании были негативными в отношении токсина Шига.

Средний возраст больных при включении составлял 40,3 лет. 68% больных были женского пола; 2 (4,8%) были черными или афроамериканцами; и 1 больной (2,4%) был азиатского происхождения. Шесть больных (14,6%) сообщили о семейной истории aHUS. Двадцать (48,7%) имели, по меньшей мере, одну идентифицированную мутацию регуляторного белка комплемента или были протестированы как позитивные в отношении аутоантитела, которое связывается с регуляторным белком комплемента. Тридцать больных (73,2%) демонстрировали первую клиническую манифестацию aHUS. У шести больных (14%) сразу инициировали лечение экулизумабом без использования замены/инфузии плазмы (PE/PI). Двадцать четыре больных (58,5%) находились на диализе в исходной точке (до лечения экулизумабом). У девяти больных (22%) ранее проводили трансплантацию почки. Двадцать семь (66%) имели количество тромбоцитов, составляющее менее $150 \times 10^9/\text{л}$. Тридцать два (78%) больных имели уровень LDH в сыворотке, более высокий, чем верхний предел нормы. Средние уровни гаптоглобина (Hp) у больных этой когорты составляли $0,6 \pm 0,4$ г/л; тогда как средние уровни креатинина сыворотки в этой когорте больных составляли $411 \pm 264,6$ мкмоль/л (N=40).

Биологические жидкости собирали при включении в исследование (до лечения), и затем в процессе лечения при каждом введении препарата. Экулизумаб вводили индивидуумам по следующей схеме: 900 мг один раз в неделю в течение четырех недель; 1200 мг в виде пятой дозы; и 1200 мг один раз каждые

две недели после этого в течение до 55 недель как часть фазы 2 клинических испытаний.

ПРИМЕР 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ПРОБЫ МОЧИ

Свежесобранную мочу сразу смешивали с ингибиторами протеазы. Концентрации нескольких анализируемых веществ, включая NGAL, цистатин С, кластерин, TIMP-1, β 2-микроглобулин, C5b9, C5a и креатинин, в моче, собранной от индивидуумов, измеряли с помощью имеющихся в продаже наборов, как кратко описано ниже.

Уровни NGAL измеряли в моче с использованием коммерчески доступного набора (R&D Systems, Minneapolis, MN; каталожный номер: DLCN20). Вкратце, образцы мочи разводили 1:3 с помощью разбавителя калибратора RD5-24 поставляемого набора. 50 мкл каждого образца или стандартного контроля набора (рекомбинантного липокалина-2 человека, экспрессированного в NS0) добавляли к лункам аналитического планшета в двух параллельных, причем каждая лунка содержала 100 мкл разбавителя RD1-52 поставляемого набора. После двух часов инкубации при 4°C в холодильнике лунки промывали четыре раза раствором для промывания 200 мкл на лунку. Меченный ферментом (пероксидазой хрена) конъюгат против NGAL добавляли по 200 мкл на лунку и инкубировали в течение двух часов при 4°C в холодильнике. Лунки промывали четыре раза раствором для промывания 200 мкл на лунку и затем добавляли раствор субстрата TMB, поставляемого в наборе (субстрата для конъюгата фермента против NGAL), 200 мкл на лунку, и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 30 минут. TMB является субстратом для пероксидазы хрена, часто используемым в ELISA. Реакция между субстратом и иммобилизованной пероксидазой хрена (HRP), конъюгированной с антителами в лунках ELISA, дает раствор синего цвета. После достижения желаемой интенсивности цвета реакцию останавливали добавлением стоп-раствора (кислоты), который меняет цвет раствора с синего на желтый. Таким образом, реакции останавливали после инкубации путем добавления в каждую лунку

стоп-раствора, поставляемого в наборе, 50 мкл на лунку, и оптическую плотность считывали при 450 нм.

Уровни цистатина С измеряли с помощью коммерчески доступного набора (R&D Systems, Minneapolis, MN; каталожный номер: DSCTC0). Вкратце, образцы мочи разводили 1:3 с помощью разбавителя калибратора RD5-24 поставляемого набора. 50 мкл каждого образца или стандартного контроля набора (рекомбинантного CysC человека) добавляли к лункам аналитического планшета в двух параллельных, причем каждая лунка содержала 100 мкл разбавителя RD1-52 поставляемого набора. После двух часов инкубации при 4°C в холодильнике лунки промывали четыре раза раствором для промывания 200 мкл на лунку. Меченный ферментом конъюгат против CysC добавляли по 200 мкл на лунку и инкубировали в течение двух часов при 4°C в холодильнике. Лунки промывали четыре раза раствором для промывания 200 мкл на лунку и затем добавляли раствор субстрата TMB, поставляемого в наборе (субстрата для конъюгата фермента против CysC), 200 мкл на лунку, и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 30 минут. Реакцию останавливали после инкубации путем добавления в каждую лунку стоп-раствора, поставляемого в наборе, 50 мкл на лунку, и оптическую плотность считывали при 450 нм.

Уровни кластерина измеряли с помощью коммерчески доступного набора (R&D Systems, Minneapolis, MN; каталожный номер: DCLU00). Вкратце, образцы мочи разводили 1:3 с помощью разбавителя калибратора RD5T поставляемого набора. 50 мкл каждого образца или стандартного контроля набора (рекомбинантного кластерина человека) добавляли к лункам аналитического планшета в двух параллельных, причем каждая лунка содержала 100 мкл разбавителя RD1-19 поставляемого набора. После двух часов инкубации при комнатной температуре на орбитальном шейкере при 500 об/мин лунки промывали четыре раза раствором для промывания 200 мкл на лунку. Меченный ферментом конъюгат против кластерина добавляли по 200 мкл на лунку и инкубировали в течение двух часов при комнатной температуре на

орбитальном шейкере при 500 об/мин. Лунки промывали четыре раза раствором для промывания 200 мкл на лунку и затем добавляли раствор субстрата TMB, 200 мкл на лунку, и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 30 минут. Реакцию останавливали после инкубации путем добавления в каждую лунку стоп-раствора, 50 мкл на лунку, и оптическую плотность считывали при 450 нм.

Уровни TIMP-1 измеряли с помощью коммерчески доступного набора (R&D Systems, Minneapolis, MN; каталожный номер: DTM100). Вкратце, образцы мочи разводили 1:2 с помощью разбавителя калибратора RD5P поставляемого набора. 50 мкл каждого образца или стандартного контроля набора (рекомбинантного TIMP-1 человека) добавляли к лункам аналитического планшета в двух параллельных, причем каждая лунка содержала 100 мкл разбавителя RD1X поставляемого набора. После двух часов инкубации при комнатной температуре на орбитальном шейкере при 500 об/мин лунки промывали три раза раствором для промывания, 200 мкл на лунку. Меченный ферментом конъюгат против TIMP-1 добавляли по 200 мкл на лунку и инкубировали в течение двух часов при комнатной температуре на орбитальном шейкере при 500 об/мин. Лунки промывали четыре раза раствором для промывания 200 мкл на лунку и затем добавляли раствор субстрата TMB, 200 мкл на лунку, и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 30 минут. Реакцию останавливали после инкубации путем добавления в каждую лунку стоп-раствора, 50 мкл на лунку, и оптическую плотность считывали при 450 нм.

Уровни β 2M измеряли с помощью коммерчески доступного набора (R&D Systems, Minneapolis, MN; каталожный номер: DBM200). Вкратце, образцы мочи разводили 1:10 с помощью разбавителя образцов поставляемого набора. 20 мкл каждого образца, контролей набора или стандартов набора добавляли в двух параллельных к лункам, содержащим меченный ферментом конъюгат против β 2M. После инкубации в течение одного часа при комнатной температуре лунки промывали шесть раз раствором для

промывания 200 мкл на лунку. Затем добавляли раствор субстрата ТМВ, 100 мкл на лунку, и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 15 минут. Реакцию останавливали после инкубации путем добавления в каждую лунку стоп-раствора, 100 мкл на лунку, и оптическую плотность считывали при 450 нм.

Уровни креатинина измеряли с помощью коммерчески доступного набора (R&D Systems, Minneapolis, MN; каталожный номер: KGE005). Вкратце, образцы мочи разбавляли 1:20 с использованием воды, и по 50 мкл образцов, контролей набора или стандартов набора добавляли в двух параллельных к лункам, содержащим 100 мкл раствора щелочного пикрата, поставляемого в наборе. После инкубации в течение 30 минут при комнатной температуре измеряли оптическую плотность при 490 нм.

Уровни C5b-9 измеряли с помощью коммерчески доступного набора (BD Biosciences, San Jose, CA; каталожный номер: 558315) и набора реагентов В optEIA (BD Biosciences, San Jose, CA; каталожный номер: 550534). Вкратце, иммобилизуемое антитело против C5b-9 разбавляли 1:250 в буфере для покрывания, 100 мкл из которого добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета MaxiSorp (Nunc; каталожный номер: 439454) и инкубировали в течение ночи при 4°C в холодильнике. Лунки промывали три раза 200 мкл на лунку раствором для промывания и блокировали путем добавления 200 мкл на лунку разбавителя для анализа, поставляемого в наборе, в течение одного часа при комнатной температуре. Лунки промывали три раза 200 мкл на лунку раствором для промывания и добавляли в лунки 100 мкл образцов мочи или стандартов набора в двух параллельных. После инкубации в течение двух часов при комнатной температуре лунки промывали три раза 200 мкл на лунку раствором для промывания. 100 мкл рабочего раствора детекторных антител против C5b-9, поставляемого в наборе, добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. Лунки промывали семь раз 200 мкл на лунку раствором для промывания и затем добавляли 100 мкл на лунку раствора субстрата ТМВ и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 30

минут. Реакцию останавливали после инкубации путем добавления в каждую лунку стоп-раствора, 50 мкл на лунку, и оптическую плотность считывали при 450 нм.

Уровни C5a измеряли с помощью коммерчески доступного набора (BD Biosciences, San Jose, CA; каталожный номер: 557965). Вкратце, 100 мкл образцов мочи или стандартов набора добавляли к лункам в двух параллельных, содержащих 50 мкл разбавителя, поставляемого в наборе ELISA. После инкубации в течение двух часов при комнатной температуре лунки промывали пять раз 200 мкл на лунку раствором для промывания. 100 мкл рабочего раствора детекторных антител против C5a, поставляемого в наборе, добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. Лунки промывали семь раз 200 мкл на лунку раствором для промывания и затем добавляли 100 мкл на лунку раствора субстрата ТМВ и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 30 минут. Реакцию останавливали после инкубации путем добавления в каждую лунку стоп-раствора, 50 мкл на лунку, и оптическую плотность считывали при 450 нм.

ПЛАЗМА

Образцы плазмы получали следующим образом. Кровь собирали в 10 мл пробирки BD™ P100 (Becton Dickinson), содержащие ЭДТА. Цельную кровь центрифугировали не позднее чем через 60 минут после получения в охлаждаемой центрифуге (установленной для поддержания 4–8°C) в течение 10 минут при 3000 об/мин. Затем после центрифугирования из образца получали плазму. Гемолизированные образцы отбрасывали.

Концентрации нескольких анализируемых веществ, в том числе Ва, фрагмента F1+2 протромбина, тромбомодулина, vWF, sC5b-9 и C5a, во фракциях плазмы крови, собранных от индивидуумов, измеряли с использованием наборов, имеющих в продаже, как кратко описано ниже.

Уровни Ва измеряли с помощью коммерчески доступного набора (Quidel, San Diego, CA; каталожный номер: A033). Вкратце, лунки аналитического планшета промывали три раза раствором для

промывания. Образцы плазмы разводили 1:1000 образцом разбавителя, поставляемым в наборе, и 100 мкл разбавленных образцов плазмы, контролей набора и стандартов набора добавляли к лункам в двух параллельных. После инкубации в течение 60 минут при комнатной температуре лунки промывали пять раз 200 мкл на лунку раствором для промывания. 100 мкл меченого ферментом конъюгата антитела против Ва добавляли к каждой лунке и инкубировали в течение шестидесяти минут при комнатной температуре. После пяти промывок раствором для промывания в каждую лунку добавляли 100 мкл субстрата ТМВ и инкубировали в течение пятнадцати минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. Реакцию останавливали путем добавления стоп-раствора, 100 мкл на лунку, и оптическую плотность считывали при 450 нм.

Уровни фрагмента 1+2 протромбина в плазме с ЭДТА измеряли с помощью набора Enzygnost F1+2 комплекта Siemens Healthcare; каталожный номер: OPBD03). Вкратце, пробы плазмы разводили 1:2 буфером для образцов и в лунки добавляли 50 мкл разведенных образцов или стандарта (содержащего известную концентрацию рекомбинантного фрагмента 1+2 протромбина человека). После инкубации в течение 30 минут при 37°C лунки промывали три раза 200 мкл на лунку раствором для промывания. 100 мкл меченого ферментом конъюгата антитела против фрагмента 1+2 протромбина добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 15 минут при 37°C. После трех дополнительных промывок 100 мкл хромогенного субстрата добавляли в каждую лунку и инкубировали 15 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. Реакцию останавливали путем добавления 100 мкл стоп-раствора к каждой лунке, и оптическую плотность считывали при 450 нм.

Уровни тромбомодулина (ТМ) в плазме с ЭДТА оценивали с помощью набора ТМ ELISA (American Diagnostica, Stamford, CT; каталожный номер: 837). Вкратце, пробы плазмы разводили 1:4 буфером для образцов, и к лункам добавляли 200 мкл разбавленных образцов или стандарта (содержащего известную концентрацию рекомбинантного ТМ). После инкубации в течение 60 минут при

комнатной температуре лунки аналитического планшета промывали четыре раза 200 мкл/лунка раствором для промывания. Добавляли раствор меченного ферментом антитела против ТМ (200 мкл на лунку) и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. После 4 промывок в каждую лунку добавляли 200 мкл субстрата, и лунки инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. Реакцию останавливали с помощью 100 мкл 0,5М H_2SO_4 и оптическую плотность измеряли при 450 нм.

Уровни активности фактора фон Виллебранда (vWF) определяли в плазме с ЭДТА с помощью набора ELISA, использующего иммобилизованные антитела, специфичные для коллагенсвязывающих сайтов vWF (American Diagnostica; каталожный номер: 885). Образцы плазмы и контроли набора разводили 1:20 разбавителем для анализа, и 100 мкл разбавленных образцов и контролей добавляли к лункам в двух параллельных. После инкубации в течение 60 минут при комнатной температуре лунки промывали 5 раз раствором для промывания и в каждую лунку добавляли 100 мкл меченного ферментом конъюгата против vWF. Лунки инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре и промывали 5 раз раствором для промывания. 100 мкл субстрата ТМВ (который, после расщепления ферментом, генерирует детектируемый сигнал) добавляли к каждой лунке. Лунки инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте с последующим добавлением к каждой лунке 100 мкл стоп-раствора, поставляемого в наборе. Оптическую плотность измеряли при 450 нм в пределах 30 минут после добавления стоп-раствора.

Циркулирующие уровни sC5b-9 определяли с помощью набора ELISA для C5b-9 человека (BD Biosciences, San Diego, CA; каталожный номер: 558315) и набора реагентов В BD optEIA (BD Biosciences; каталожный номер: 550534). Вкратце, иммобилизуемое антитело против C5b-9 разводили 1:250 в покрывающем буфере, поставляемом в наборе, 100 мкл которого добавляли к лункам 96-луночного планшета MaxiSorp (Nunc) и инкубировали в течение ночи при 4°C. После трех промывок раствором для промывания

лунки блокировали 200 мкл разбавителя для анализа, поставляемого в наборе, в течение одного часа при комнатной температуре. После еще 3 промывок раствором для промывания добавляли 100 мкл образцов плазмы (разведенных 1:100 разбавителем для анализа) или стандартов (содержащих известную концентрацию очищенного sC5b-9) и инкубировали в течение двух часов при комнатной температуре. Лунки промывали три раза раствором для промывания и в каждую лунку добавляли 100 мкл рабочего детектирующего раствора (который содержит меченное биотином детектирующее антитело против C5b-9 и стрептавидин, меченный пероксидазой хрена, в разведении 1:250 разбавителем для анализа). После инкубации в течение одного часа при комнатной температуре лунки промывали семь раз раствором для промывания, и в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора субстрата TMB. Реакции давали развиваться в течение 30 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. После добавления к каждой лунке 50 мкл стоп-раствора определяли оптическую плотность при 450 нм.

Циркулирующие уровни C5a определяли с помощью сендвич-метода ELISA, использующего набора реагентов В BD optEIA (BD Biosciences; каталожный номер: 550534). Все инкубации проводили в присутствии футана (BD Biosciences; каталожный номер: 550236). Вкратце, иммобилизуемое антитело против C5a разводили до 2 мкг/мл в покрывающем буфере, поставляемом в наборе, 100 мкл которого добавляли к лункам 96-луночного планшета MaxiSorp (Nunc) и затем инкубировали в течение ночи при 4°C. После трех промывок раствором для промывания, лунки блокировали 200 мкл разбавителя для анализа в течение одного часа при комнатной температуре. После еще 3 промывок раствором для промывания добавляли 50 мкл образцов плазмы (разведенных 1:5 разбавителем для анализа) или стандартов (содержащих известную концентрацию C5a) и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. Лунки промывали 4 раза раствором для промывания и в каждую лунку добавляли 100 мкл рабочего детектирующего раствора (который содержит меченное биотином детектирующее

антитело против C5a и стрептавидин, меченный пероксидазой хрена, в разведении 1:250 разбавителем для анализа). После инкубации в течение одного часа при комнатной температуре лунки промывали семь раз раствором для промывания, и в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора субстрата TMB. Реакции давали развиваться в течение 30 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. После добавления к каждой лунке 50 мкл стоп-раствора измеряли оптическую плотность при 450 нм.

СЫВОРОТКА

Образцы сыворотки обрабатывали следующим образом. Кровь собирали в 10 мл пробирки-вакутейнеры (SST) для отделения сыворотки. Пробирку переворачивали пять раз, и крови давали свернуться при комнатной температуре в течение, по меньшей мере, 30 минут, но не более двух часов. Пробирку центрифугировали при 1800 g с тормозом. Гемолизированные образцы отбрасывали.

Количественное определение различных анализируемых веществ в сыворотке осуществляли с использованием наборов для цитометрии на матрице с шариками для человека (CBA) Flex Set (CBA Flex Set; Becton Dickinson Biosciences, San Diego, CA), и с применением проточного цитометра (FACS ЛСР II, Becton Dickinson) в соответствии с инструкциями изготовителя. Захватывающий шарик Flex Set представляет собой одну популяцию шариков с четкой интенсивностью флуоресценции и покрыт иммобилизованным антителом, специфичным для растворимого белка. Положение каждой популяции шариков дано в буквенно-цифровом обозначении с указанием его положения по отношению к другим шарикам в системе BD CBA Flex Set. Шарика с разными положениями могут быть объединены в анализах для создания мультиплексного анализа. В анализе Flex Set захватывающий шарик, конъюгированный с PE, детектирующий реагент и стандарт или тестируемые образцы инкубируют вместе с образованием сендвичных комплексов.

Вкратце, смешивали стандарты для каждого анализируемого вещества и проводили последовательное разведение с использованием разбавителя для анализа. Получали захватывающие

шарики для каждого анализируемого вещества и объединяли с помощью разбавителя захватывающих шариков для сыворотки/плазмы. Образцы сыворотки разводили соответствующим образом и вместе со стандартами инкубировали со смешанными захватывающими шариками в суммарном объеме 100 мкл в течение одного часа при комнатной температуре. Реагенты для обнаружения фикоэритрина (PE) смешивали для всех анализируемых веществ и добавляли к пробиркам (50 мкл). Образцы промывали промывочным буфером после инкубации в течение двух часов при комнатной температуре в темноте и анализировали на проточном цитометре после восстановления осадка в промывочном буфере.

Следующие наборы шариков инкубировали с образцами сыворотки, разведенными 1:4 в разбавителе для анализа, поставляемом в наборе, (где конкретный белковый биомаркер указывает на иммобилизованное антитело, конъюгированное с шариком): IFN- γ (шарик E7; каталожный номер: 558283); IL-12 p70 (шарик E5; каталожный номер: 558283); IL- β (шарик B4; каталожный номер: 558279); IL-6 (шарик A7; каталожный номер: 558276); IL-8 (шарик A9; каталожный номер: 558277); CXCL-9 (шарик E8; каталожный номер: 558286); CXCL-10 (шарик B5; каталожный номер: 558280); MCP-1 (шарик D8; каталожный номер: 558287); VEGF (шарик B8; каталожный номер: 558336); и sCD40L (шарик C7; каталожный номер 560305). Следующие наборы шариков инкубировали с образцами сыворотки, разбавленными в отношении 1:50 разбавителем, поставляемым в наборе: ICAM-1 (шарик A4; каталожный номер: 560269); VCAM-1 (шарик D6; каталожный номер: 560427); TNFR1 (шарик C4; каталожный номер: 560156); E-селектин (шарик D9; каталожный номер: 560419); P-селектин (шарик D7; каталожный номер: 560426); и CCL5 (шарик D4; каталожный номер: 558324).

ПРИМЕР 2: РЕЗУЛЬТАТЫ

МАРКЕРЫ ТЕКУЩЕЙ АКТИВАЦИИ КОМПЛЕМЕНТА

Как показано в таблице 2 ниже, концентрации компонента Ba комплемента и sC5b9 в плазме и концентрация C5a и sC5b-9 в моче повышены у большинства больных aHUS по сравнению с

концентрацией в образце биологической жидкости от здоровых добровольцев. Смотри также фиг. 1.

Таблица 2.

Белковый маркер aHUS	n/N (%) повышения над исходным уровнем	Величина P
Ba в плазме	35/35 (100,0)	<0,0001
sC5b-9 в плазме	37/38 (97,4)	<0,0001
C5a в моче	26/29 (89,7)	0,0007
sC5b-9 в моче	23/27 (85,2)	0,0025

* «N» обозначает общее количество больных, обследуемых на данный биомаркер, и «n» указывает на количество этих больных «N» с повышенным уровнем белкового биомаркера.

Эти результаты показывают, что существенная активация системного альтернативного пути комплемента продолжается у больных aHUS.

После лечения экулизумабом средние уровни (концентрации) этих биомаркеров aHUS снижались (фиг. 1A-C). Средние уровни C5a и sC5b-9 в моче существенно снижались между 1 и 2,5 неделями после начала лечения и оставались такими. Средний процент снижения уровней C5a в моче составлял более 40% через 3 недели после лечения и более 70% через 6 недель (фиг. 1D). Уровни sC5b-9 в моче снижались более чем на 60% через 3 недели (фиг. 1E). Эти маркеры в конечном итоге нормализовались. Уровни Ba в плазме также существенно снижались ($p=0,0053$) примерно через от четырех до шести недель после лечения экулизумабом, предполагая, что со временем экулизумаб уменьшит инициацию или усиление классического пути комплемента (фиг. 1C). Однако средний процент снижения уровней Ba в плазме составлял приблизительно 10% через 6 недель и более 30% к 12 неделе (фиг. 1F).

Процент больных aHUS, получавших лечение, которые имели нормализованные уровни белковых биомаркеров комплемента в зависимости от времени показан на фиг. 2A-C. Например, как показано на фиг. 2B, 50% больных aHUS, получавших лечение, имеют нормализованные уровни sC5b-9 в моче через 2,5 недели

после начала лечения экулизумабом. К 17 неделе после начала лечения 79% больных aHUS, получавших лечение, имели нормализованные уровни sC5b-9. Однако уровни Ва не нормализуются у большинства больных (фиг. 1С и 2С). Эти данные показывают, что даже при лечении экулизумабом у некоторых больных может существовать низкий уровень активации комплемента.

Маркеры тромбоцитов и активация гемостаза

Как суммировано в таблице 3 ниже, концентрация sCD40L в сыворотке и уровни фрагмента 1+2 протромбина и D-димера в плазме были значительно выше у большинства больных aHUS по сравнению с концентрацией в образце биологической жидкости от здоровых добровольцев. Смотри также фиг. 3А-В.

Таблица 3.

Белковый маркер aHUS	n/N (%) повышения над исходным уровнем	Величина Р
sCD40L	36/38 (94,7)	<0,0001
Фрагмент F1+2 протромбина	36/38 (94,7)	<0,0001
D-димер	34/36 (94,4)	=0,0002

* «N» обозначает общее количество больных, обследуемых на данный биомаркер, и «n» указывает на количество этих больных «N» с повышенным уровнем белкового биомаркера.

Высвобождение sCD40L обычно связано с метаболизмом и активностью тромбоцитов. Фрагменты F1+2 протромбина генерируются во время превращения протромбина в тромбин, в то время как D-димер представляет собой продукт деградации фибрина, указывающий на фибринолиз.

После лечения экулизумабом средние уровни (концентрации) этих биомаркеров aHUS снижались. Средние уровни F1+2 и D-димера в плазме существенно снижались между 1 и 2,5 неделями ($p=0,0078$ и $0,0083$ соответственно) после начала лечения и оставались такими. Как показано на фиг. 3С, средний процент снижения F1+2 составлял приблизительно 15% через 3 недели и более 50% через 12 недель. Средний процент снижения уровней d-димера составлял

приблизительно 40% через 6 недель, но выше 60% через 12 недель. Эти данные показывают, что лечение экулизумабом имеет непосредственное влияние на пути коагуляции и фибринолиза. Как показано на фиг. 4А-В, 32% больных аHUS, получавших лечение, характеризуются нормализацией уровней F1+2 через 26 недель после начала лечения и 46% больных имеют нормализованные уровни D-димера. В отличие от этого уровни sCD40L оставались повышенными на протяжении всего исследования.

Маркеры повреждения и/или активации эндотелиальных клеток

Как показано в таблице 4 ниже, концентрации тромбомодулина и vWF в плазме и концентрации VCAM-1 в сыворотке были значительно выше у больных аHUS по сравнению с концентрацией в образце биологической жидкости от здоровых добровольцев. Смотри также фиг. 5А-С.

Таблица 4.

Белковый маркер аHUS	n/N (%) повышения над исходным уровнем	Величина Р
Тромбомодулин	33/34 (97,1)	<0,0001
VCAM-1	36/38 (94,7)	<0,0001
Антиген фактора фон Виллибранда	15/38 (39,5)	<0,02

* «N» обозначает общее количество больных, обследуемых на данный биомаркер, и «n» указывает на количество этих больных «N» с повышенным уровнем белкового биомаркера. n.s. указывает на отсутствие значимости различий.

Высокая концентрация тромбомодулина и VCAM-1 в биологических жидкостях больных аHUS свидетельствует о значительной активации эндотелиальных клеток. Тромбомодулин высвобождается в ответ на С3а, что дополнительно подчеркивает постоянную активацию комплемента у больных аHUS. Концентрация vWF также значительно повышена. vWF характеризуется рядом физиологических функций, включая адгезию тромбоцитов и свертывание, а также является маркером повреждения и активации эндотелия.

После лечения экулизумабом средние уровни (концентрации)

этих биомаркеров aHUS были снижены (фиг. 5A-C). Средние уровни тромбомодулина и VCAM-1 были значительно снижены по сравнению с исходными через 17 недель ($p=0,0007$ и $<0,0001$, соответственно) после начала лечения (смотри фиг. 6C и 6D). Через 26 недель уровни VCAM-1 и vWF также уменьшались. Тем не менее, в то время как vWF нормализовался у ~70% больных aHUS, получавших лечение, через 17 недель после начала лечения (фиг. 6B), уровни тромбомодулина и VCAM-1 оставались повышенными. Интересно, что из 10% больных, у которых уровни тромбомодулина нормализовались (фиг. 6A), только один больной имел нормализованные уровни как тромбомодулина, так и vWF. Эти данные показывают, что лечение экулизумабом характеризуется быстрым и надежным положительным эффектом в отношении коррекции повреждения и активации эндотелиальных клеток.

МАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ

В таблице 5 (ниже) представлены серии анализируемых веществ, определяемых в плазме и/или сыворотке, и указан процент больных aHUS, у которых соответствующие анализируемые вещества были повышены до лечения ингибитором комплемента.

Таблица 5.

Белковый маркер aHUS	n/N (%) повышения над исходным уровнем	Величина P
CXCL10 в сыворотке	23/38 (60,5)	$P<0,0001$
CXCL9 в сыворотке	33/38 (86,8)	$P<0,0001$
IL-18	19/38 (50,0)	$P<0,0001$
MCP-1	34/38 (89,5)	$P<0,0001$
TNFR1	38/38 (100,0)	$P<0,0001$
VEGF	25/38 (65,8)	$P<0,0001$
IL-6	21/34 (61,8)	$P=0,0019$
CCL5	4/38 (10,5)	$P=0,0045$
IFN- γ	5/34 (14,7)	$P=0,0353$
IL-8	22/38 (57,9)	n.s. ($P=0,0640$)
ICAM-1	2/34 (5,9)	n.s

IL-1 β	1/38 (2,6)	n.s
IL-12p70	2/34 (5,9)	n.s

* «N» обозначает общее количество больных, обследуемых на данный биомаркер, и «n» указывает на количество этих больных «N» с повышенным уровнем белкового биомаркера.

** Концентрации двух анализируемых веществ, отмеченных как «в сыворотке» измеряли в сыворотке крови. Концентрации всех других анализируемых веществ в таблице измеряли в плазме.

n.s. указывает на отсутствие значимости различий.

До лечения экулизумабом больные аHUS характеризовались повышенными уровнями циркулирующих воспалительных цитокинов и хемокинов, включая, например, CXCL-10, CXCL-9, IL-18, TNFR1, MCP-1, VEGF, IL-6 и IL-8. После начала лечения, однако, TNFR1 был самым ранним маркером воспаления, который существенно снижался (через 6 недель, $p=0,0012$) (фиг. 7A). Средняя концентрация TNFR1 оставалась существенно ниже исходной при всех последующих визитах ($p<0,0001$), но нормализовалась только у 6% больных аHUS (фиг. 7B). Аналогично, средние уровни CXCL10 были значительно снижены через 26 недель ($p=0,0055$), но не нормализовались у всех больных аHUS (не нормализовались у 31% больных). Через 26 недель средние уровни IFN- γ нормализовались приблизительно у 50% больных; однако, средние уровни сывороточного IL-8 ($p=0,01$), CXCL-9 ($p=0,01$), IL-18 ($p<0,0001$) и VEGF ($p<0,0001$) оставались повышенными у большинства больных аHUS по сравнению с нормальными контролями, и незначительно отличались от исходного уровня. IL-6 сыворотки был значительно снижен ($p=0,04$) по сравнению с исходным на 26-й неделе и оставался повышенным на 26-й неделе по сравнению с нормальным контролем.

Напротив, средние уровни CCL-5 были существенно повышены через 17 недель после начала лечения и после этого ($p=0,0072$ и $0,0021$ через 12-17 недель и 26 недель, соответственно). В ответ на повреждение сосудов у мышей позитивно регулируется CCL5, который стимулирует селективную инфильтрацию Т-клеток как часть ответа на повреждение-заживление сосудов. Смотри, например,

Rookmaaker et al. (2007) Am J Physiol Renal Physiol 293(2):F624-630. Эти данные показывают, что лечение экулизумабом характеризуется быстрым и надежным положительным влиянием на воспаление у многих больных aHUS, но, что низкий уровень воспаления может существовать у этих больных даже во время лечения.

МАРКЕРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕЧНЫХ КАНАЛЬЦЕВ И КЛУБОЧКОВ

В таблице 6А (ниже) представлены серии анализируемых веществ, определяемых в моче, собранной у больных, и указан процент больных aHUS, у которых соответствующие анализируемые вещества были повышены до лечения ингибитором комплемента.

Таблица 6А.

Белковый маркер aHUS	n/N (%) повышения над исходным уровнем	Величина P
Бета-2 микроглобулин ($\beta 2M$)	20/28 (71,4)	P<0,0001
Кластерин	24/29 (82,8)	P<0,0001
Цистатин С	18/29 (62,1)	P=0,0002
TIMP-1	22/29 (75,9)	P=0,0003
FABP-1	22/29 (75,9)	P=0,0130
NGAL	5/29 (17,2)	P=0,0151
NAG	3/23 (13,0)	P=0,0413
CXCL10	2/29 (6,9)	n.s.
CXCL9	2/29 (6,9)	n.s.
KIM-1	2/29 (6,9)	n.s.

* «N» обозначает общее количество больных, обследуемых на данный биомаркер, и «n» указывает на количество этих больных «N» с повышенным уровнем белкового биомаркера. n.s. указывает на отсутствие значимости различий.

Перед лечением экулизумабом молекулы с низкой молекулярной массой, которые обычно фильтруются почками, были повышены в моче больных aHUS, включая $\beta 2M$, кластерин, цистатин С и NAG. Молекулы, продуцируемые эпителиальными клетками почечных канальцев в ответ на повреждение, были также повышены, например, TIMP-1, NGAL и L-FABP. Однако при лечении экулизумабом CysC (p=0,0012) (фиг. 8А), кластерин (p=0,0446), и TIMP-1 (p=0,0353) значительно снижались через 1-2,5 недели

после начала лечения, и они оставались существенно пониженными на протяжении всего исследования. NGAL ($p=0,0003$) (фиг. 8С), L-FABP ($p=0,0366$), и NAG ($p=0,0369$) были существенно ниже по сравнению с исходным уровнем через 4–6 недель после начала лечения и оставались такими после этого. $\beta 2M$ был существенно снижен через 12–17 недель ($p=0,0008$) и далее (фиг. 8В). Через 26 недель средние уровни в моче всех анализируемых веществ нормализовались у больных aHUS.

Эти данные показывают, что лечение экулизумабом характеризуется быстрым, надежным и долговременным положительным влиянием, восстанавливая повреждение почечных канальцев и клубочков, с которым сталкиваются многие больные aHUS.

РЕЗЮМЕ

В следующей таблице приводится сводка иллюстративных биомаркеров aHUS (хотя это не исчерпывающий список), которые повышены у больных aHUS до лечения экулизумабом, но значительно снижены после лечения экулизумабом. В таблице (таблице 6В) также представлено среднее время после начала лечения экулизумабом, в момент которого произошло значительное снижение биомаркера aHUS.

Таблица 6В.

Биомаркер	1-2,5 недели	4-6 недель	12-17 недель	26 недель
U-C5a	X			
U-C5b-9	X			
F1+2	X			
D-димер	X			
U-Cys-C	X			
U-TIMP-1	X			
Ba в плазме		X		
TNFR1		X		
U-CLU		X		
U-NGAL		X		
Тромбомодулин			X	

VCAM			X	
L-FABP			X	
B2M			X	
CXCL10				X
IFN- γ				X

ИСХОДНЫЕ УРОВНИ МАРКЕРОВ АНУС У БОЛЬНЫХ АНУС, НАХОДЯЩИХСЯ НА ДИАЛИЗЕ И/ИЛИ ПОДВЕРГАВШИХСЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ

Оценивали также концентрацию в плазме и моче маркеров комплемента, воспаления и повреждения почек у больных аНУС, находящихся на диализе, перед лечением экулизумабом. Как показано в таблице 7 (ниже), средняя концентрация TNFR1 сыворотки, Ва плазмы, C5b9, фрагментов 1+2 протромбина, β 2M, кластерина, sC5b9, TIMP-1, NGAL, CysC и C5a была значительно повышена у больных аНУС, которые находились на повторном диализе (например, два или более раз в течение 6 месяцев до лечения), по сравнению с больными аНУС, которые не находились на повторном диализе до включения в исследование (перед лечением). Смотри также фиг. 9А-Е.

Таблица 7.

Анализируемое вещество	Выше при повторном диализе
TNFR1 (сыворотка)	p=<0,0001
β 2m (моча)	p=0,0009
Кластерин (моча)	p=0,0020
Ва (плазма)	p=0,0021
C5b-9 (моча)	p=0,0042
TIMP-1 (моча)	p=0,0070
NGAL (моча)	p=0,0110
CysC (моча)	p=0,020
F1+2 (плазма)	p=0,0191
C5b-9 (плазма)	p=0,0476
C5a (моча)	p=0,0477

** Концентрацию одного анализируемого вещества с маркировкой «сыворотка» измеряли в сыворотке. Концентрацию анализируемых веществ с маркировкой «моча» измеряли в моче, в то время как концентрацию анализируемых веществ с маркировкой «плазма» измеряли в плазме, полученной от больных.

Кроме того, больные aHUS, которым пересаживали почку до начала лечения экулизумабом, имели более низкие C5b-9 и FABP-1 в моче на исходном уровне по сравнению с больными, которым не пересаживали почку.

ИСХОДНЫЕ УРОВНИ МАРКЕРОВ aHUS ОТНОСИТЕЛЬНО МАРКЕРОВ ТМА

Уровни некоторых биомаркеров, связанных с aHUS, у некоторых больных aHUS коррелирует с маркерами аномальной тромботической микроангиопатии (ТМА), например, снижение количества тромбоцитов, повышенная LDH и повышенный уровень гаптоглобина. Например, больные aHUS со сниженным количеством тромбоцитов на исходном уровне (<150000 в мкл крови) демонстрировали повышенные уровни цистатина С мочи ($P=0,0276$) и кластерина мочи ($P=0,0401$). Смотри фиг. 14А-В. Больные aHUS, имеющие повышенные уровни LDH, характеризовались повышенными уровнями VCAM-1 ($P=0,0226$) (фиг. 14С), D-димера ($P=0,0369$) (фиг. 14D), IL-18, тромбомодулина и TNFR1 (смотри ниже). Повышенные уровни гаптоглобина часто присутствовали у больных aHUS, характеризующихся повышенными уровнями IL-18.

ИСХОДНЫЕ УРОВНИ МАРКЕРОВ aHUS У БОЛЬНЫХ aHUS, ПОЛУЧАЮЩИХ ЛЕЧЕНИЕ ПЛАЗМОЙ

Больные aHUS с повторным лечением плазмой перед лечением экулизумабом характеризовались более высокими средними уровнями цистатина С в моче на исходном уровне (смотри фиг. 15).

КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ УРОВНЯМИ БИОМАРКЕРОВ И КЛИНИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ

ТРОМБОЦИТЫ

Повышенный уровень SCL5 положительно коррелировал с более высоким количеством тромбоцитов на исходном уровне ($p=<0,0001$; cc (коэффициент корреляции)=0,8106). Повышенный уровень sCD40L

также коррелировал с более высоким количеством тромбоцитов на исходном уровне ($p < 0,001$; $ss = 0,6313$).

Кроме того, больные с нормализованными уровнями Ва после лечения экулизумабом продемонстрировали значительно более высокий рост тромбоцитов, чем больные, у которых уровни Ва оставались повышенными после лечения. Смотри фиг. 13.

РАСЧЕТНАЯ СКОРОСТЬ КЛУБОЧКОВОЙ ФИЛЬТРАЦИИ (eGFR), LDH И КОМПЛЕМЕНТ МОЧИ

Корреляция наблюдалась также между повышенными уровнями Ва в плазме и снижением eGFR ($p < 0,0001$; $ss = -0,7219$). Повышенная концентрация TNFR1 в сыворотке крови больных aHUS до лечения коррелировала с уровнями лактатдегидрогеназы (LDH) ($p = 0,027$; $ss = 0,3586$), но более достоверно коррелировала с более низкой eGFR ($p < 0,0001$; $ss = -0,6134$). Кроме того, более высокие уровни компонентов C5a и sC5b-9 комплемента в моче и маркеров повреждения почек ($\beta 2M$, кластерина, цистатина С, NGAL и TIMP-1) умеренно коррелировали с более низкой eGFR ($p =$ от 0,0002 до 0,0242; $ss =$ от -0,4286 до -0,6714).

Повышенные уровни sC5b-9, кластерина и TIMP-1 в моче умеренно коррелировали с протеинурией ($p =$ от 0,0086 до 0,0284; $ss =$ от 0,40 до 0,4788), в то время как повышенные уровни Ва в плазме ($p = 0,0017$; $ss = 0,517$), $\beta 2M$, кластерина, sC5b-9 мочи и цистатина С коррелировали с повышенным креатинином в моче больных перед лечением экулизумабом ($p = 0,0018-0,0440$; $ss = 0,3982-0,6457$).

ПЕРВОЕ КЛИНИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ AHUS

Наблюдалась также корреляция между больными, испытывающими свою первую манифестацию aHUS, и значительно повышенными уровнями D-димера в плазме или FABP-1 в моче на исходном уровне (до лечения экулизумабом) (см таблицу 8).

Таблица 8.

Биомаркер	Повышенные биомаркеры (n %)		Величина p
	Единственная манифестация aHUS	Множественные манифестации	

D-димер плазмы (мкг/л)	27 (100,0)	7 (77,8)	0,0571
FAVR-1 мочи (нг/мг с нормализацией на креатинин)	19 (90,5)	3 (37,5)	0,0079

ВЯЛОТЕКУЩЕЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ

Шесть больных aHUS, участвующих в исследовании, характеризовались при включении нормализованными гематологическими показателями (включая гаптоглобин, LDH и количество тромбоцитов). Тем не менее, эти больные все еще демонстрировали наличие хронического воспаления и активации комплемента, несмотря на стабильную клиническую картину. Больные имели достоверно повышенные уровни сывороточного TNFR1 (как показано на фиг. 10A), а также значительно повышенные уровни тромбомодулина, Ва (фиг. 10B), фрагментов 1+2 протромбина (фиг. 10E), VCAM-1 (фиг. 10C) и D-димера (фиг. 10D). Сходно больные с нормальными количествами тромбоцитов ($>150 \times 10^9$ тромбоцитов/мкл) на исходном уровне все еще демонстрировали повышенные уровни большинства биомаркеров (например, Ва (фиг. 10F), VCAM-1 (фиг. 10G), D-димера (фиг. 10H) и F1+2 (фиг. 10I)). Взяты вместе, эти данные указывают на то, что даже в подгруппе больных aHUS с предполагаемой клинической ремиссией после лечения существуют вероятность текущих низких уровней активности комплемента, коагулопатии и воспаления.

КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ УРОВНЯМИ БИОМАРКЕРОВ И КЛИНИЧЕСКИМИ ИСХОДАМИ

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ОТВЕТЫ

Больные с полными гематологическими ответами продемонстрировали более резкое снижение TNFR1, кластерина в моче и уровней комплемента в моче (C5A и C5b-9) (фиг. 11). Например, 86% больных, характеризующихся пониженной концентрацией этих белковых биомаркеров aHUS, достигали полного гематологического ответа (нормализации тромбоцитов и LDH) через

12-17 недель после начала лечения экулизумабом. Кроме того, эти больные продемонстрировали более сильное снижение среднего процента TNFR1 в сыворотке, кластерина в моче, C5a в моче и C5b-9 в моче, чем больные, которые не достигали полного гематологического ответа.

Обнаружено также, что скорость снижения TNFR1 (например, через 12 недель по сравнению с 17 неделями или выше) коррелирует с полнотой гематологического ответа ($p=0,0008$). Скорость нормализации D-димера была значимо связана с полным гематологическим ответом ($p=0,0109$; $ss=6,26$).

Кроме того, данные показывают, что значительно большее увеличение числа тромбоцитов через 12-17 недель ($p=0,0022$) и через 26 недель ($p=0,0110$) было достигнуто у больных, страдающих aHUS, получавших лечение экулизумабом, (через 12-17 недель и через 26 недель, соответственно) при нормализации концентрации Va плазмы. Улучшение количества тромбоцитов коррелировало со значительным снижением средних уровней F1+2 через 4-6 недель ($P=0,0148$; $ss=-0,4087$) и через 12-17 недель ($P=0,0073$; $ss=-0,4396$) и более умеренно со снижением уровней d-димера через 12-17 недель ($P=0,0470$; $ss=-0,3381$). Тем не менее, у части больных, несмотря на демонстрацию более сильного увеличения количества тромбоцитов через от четырех до 26 недель, продолжали выявляться значительно повышенные уровни фрагментов 1+2 протромбина, тромбомодулина, $\beta 2M$ мочи, кластерина, TIMP-1 и цистатина C, предполагая лежащую в основе постоянную активность заболевания.

Анализ данных, полученных при исследовании, также выявил корреляцию между изменением концентрации других белковых биомаркеров и восстановлением тромбоцитов. Например, концентрация CCL5, MCP-1 и sCD40L положительно коррелировала с увеличением количества тромбоцитов у больных, получавших лечение экулизумабом, как показано в таблице 9 ниже.

Таблица 9.

Неделя после начала лечения	Биомаркер	Величина P	Коэфф. корреляции
--------------------------------	-----------	------------	----------------------

экулизумабом			
1-2,5	CCL-5	p<0,0001	0,7419
	sCD40L	P=0,0141	0,3950
	VEGF	P=0,0014	0,5002
4-6	CCL-5	p<0,0001	0,7743
	sCD40L	p<0,0001	0,6818
	MCP-1	P=0,0114	0,4169
12-17	CCL5	P=0,0003	0,5656
26	CCL-5	p<0,0001	0,7845
	sCD40L	P=0,0012	0,5398

ТРОМБОМИКРОАНГИОПАТИЯ (ТМА)

Больные aHUS, получавшие лечение экулизумабом, демонстрирующие более сильное снижение уровней Ва в плазме, более часто достигали полного ответа ТМА (например, нормализации гематологических показателей (например, тромбоцитов и уровня LDH) и сохранения функции почек). Например, 72,7% больных достигали полного ответа ТМА через 12-17 недель и 85,29% больных достигали полного ответа ТМА через 26 недель. Как показано на фиг. 12, эти больные продемонстрировали более высокий средний процент снижения концентрации Ва в плазме, чем больные, которые не достигали полного ответа ТМА (p=0,0018 и p=0,006, соответственно).

eGFR ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ

Наблюдалась также взаимосвязь между снижением и/или нормализацией некоторых биомаркеров и улучшением eGFR. Например, значительно более выраженное улучшение (таблица 10) eGFR (например, eGFR $\geq$ 15 мл/мин/1,73 м², поддерживаемое в течение, по меньшей мере, двух последовательных измерений, полученных, по меньшей мере, с разницей в четыре недели) наблюдалось у больных с нормализованными MCP-1, IL-6 и IFN- γ (через 4-6 недель); нормализованными VCAM-1, CXCL10, CXCL9 и Ва (через 12-17 недель) и нормализованными Ва, β 2М мочи, CysC мочи, vWF, D-димера, кластерином, CXCL10, CXCL9, FABP-1 мочи и другими (через 26 недель) (таблица 10). Смотри также фиг. 16.

Таблица 10.

Неделя после начала лечения экулизумабом	Нормализованный биомаркер	Величина P
1-2, 5	*	*
4-6	MCP-1	0,0002
	IL-6	0,0251
	VCAM-1	0,0166
12-17	VCAM-1	0,0003
	CXCL-10	0,0071
	Ba	0,0299
	CXCL-9	0,0441
26	VCAM-1	<0,0001
	Цистатин С	<0,0001
	Ba	0,0002
	U- β 2m	0,0013
	CXCL9	0,0027
	CXCL10	0,0172
	vWF	0,0052
	D-димер	0,0224
	L-FABP	0,0230
	Кластерин	0,0300
	F1+2	0,0460

ПРИМЕР 3. ИСХОДНЫЕ УРОВНИ СЕЛЕКТИВНЫХ БЕЛКОВЫХ БИОМАРКЕРОВ аНУС У БОЛЬНЫХ аНУС

На исходном уровне до лечения экулизумабом реальные доказательства значительной активации комплемента, воспаления/повреждения сосудов и повреждения органов наблюдались у больных аНУС, независимо от использования замены плазмы/инфузии плазмы или от нормальных лабораторных

показателей количества тромбоцитов, H_r или LDH. Как видно из данных, представленных в таблице 11, при aHUS концентрации биомаркеров активности комплемента, воспаления сосудов, активации эндотелия и повреждения, свертывания и повреждения почек были значительно повышены у больных aHUS по сравнению со здоровыми индивидуумами.

Таблица 11.

Патогенез заболевания	Биомаркер (диапазон NHV; единицы)	Уровень медианы на BL [диапазон] (Величина P относительно NHV**)	n/N (%) повышения над BL	Кратность повышения над NHV на BL
Активация САР	Ва плазмы (388,0-588,0 нг/мл)	2676,4 [935,0-3668,0] ($<0,0001$)	35/35 (100)	5,53
Терминальная активация комплемента	U-C5a (0,0-0,7 нг/мг U- креат.)	9,00 [0,3-76,6] (0,0007)	26/29 (89,7)	45
	U-sC5b-9 (0,0-0,6 нг/мг U-креат.)	30,50 [0,2-665,7] (0,0025)	23/27 (85,2)	305
Воспаление	sTNFR1 (407,3-1391,3 пг/мл)	17616,85 [4008,5-54158,2] ($<0,0001$)	38/38 (100)	18,71
Активация эндотелия	sVCAM-1 (159,2-444,7 нг/мл)	659,75 [375,4-1865,5] ($<0,0001$)	36/38 (94,7)	1,99
Повреждение эндотелия	TM (2,0-3,6 нг/мл)	10 [3,4-24,1] ($<0,0001$)	33/34 (97,1)	3,64
Свертывание	F1+2 (82,9-305,5 пмоль/л)	1017,55 [217,7-5774,0] ($<0,0001$)	36/38 (94,7)	5,46
	D-димер (157,0-395,9 мкг/л)	2735 [330,0-44100,0] (0,0002)	34/36 (94,4)	9,84
Повреждение почек	U-кластерин (5,7-437,1 нг/мг U- креат.)	1232,30 [129,9-6091,2] ($<0,0001$)	24/29 (82,8)	8,62

	U-TIMP-1 (0,0-5,4 нг/мг U-креат.)	23,8 [1,4-230,4] (0,0003)	22/29 (75,9)	39,67
	U-L-FABP-1 (0,0-16,9 нг/мг U-креат.)	58,00 [3,7-1309,8] (0,0130)	22/29 (75,9)	48,33
	U-β2m (0,0-2,7 мкг/мг U-креат.)	18,4 [0,4-127,7] ($<0,0001$)	20/28 (71,4)	46
	U-цистатин-С (0,3-301,3 нг/мг U-креат.))	1256,9 [14,3-7189,6] (0,0001)	18/26 (69,2)	23,85

NHV обозначает величину или концентрацию данного белкового биомаркера aHUS, представленную в таблице, для нормального человека.

«креат.» обозначает креатинин, концентрация которого используется для нормализации концентраций определенных биомаркеров, представленных в таблице.

SAP относится к альтернативному пути комплемента (смотри выше).

«BL» относится к «исходному уровню», т.е. до начала лечения экулизумабом.

«N» представляет собой суммарное количество больных, обследованных в отношении данного патологического процесса и биомаркера. «n» представляет собой количество больных «N», у которых данный биомаркер был повышен.

«U» обозначает, что анализируемое вещество измеряли в моче.

* Величины P рассчитаны с использованием теста рангового критерия Вилкоксона при тестировании на различия между группами.

Кроме того, авторы изобретения обнаружили, что нет статистически значимых различий между исходными повышенными уровнями определенных биомаркеров aHUS, выявляемыми у больных, которым проводили или проводят лечение с помощью плазмафереза (PE) или инфузии плазмы (PI), по сравнению с уровнем повышения биомаркеров aHUS у больных, которым не проводили лечение с помощью PE или PI. Например, концентрации Ba, sTNFR1, sVCAM-1 и D-димера не снижались или нормализовались у больных, которым проводили лечение с помощью PE/PI (фиг. 17A-D). Следует отметить, что только 3 из 26 больных, используемым для анализа в данных, представленных на фиг. 17A-D не проводили PE/PI. Большинство больных (n=23) имели повышенные уровни цистатина С по сравнению с нормальными здоровыми добровольцами. Учитывая, что цистатин С представляет собой биомаркер повреждения почек (повреждения клубочков), можно предположить, что больные, которым не проводили PE/PI, имели меньшее повреждение своих почек и, таким образом демонстрировали пониженные уровни белковых биомаркеров, связанных с повреждением почек, в моче.

Аналогичным образом на исходном уровне до лечения экулизумабом концентрации белковых маркеров активации комплемента (например, Ba), воспаления (например, sTNFR1), активации эндотелиальных клеток (sVCAM-1), свертывания (D-димер) и повреждения почек (цистатин-С) были повышены у больных aHUS, имеющих нормальное количество тромбоцитов. Смотри фиг. 18A-E. А у больных с нормальными уровнями Hb и LDH показано наличие постоянной активации комплемента, воспаления, активации эндотелиальных клеток, свертывания и повреждения почек (смотри фиг. 19A-E).

В свете вышеизложенного концентрация биомаркеров, отражающих активность комплемента, воспаление сосудов, активацию и повреждение эндотелия, свертывание, и повреждение почек, хронически повышена у больных aHUS по сравнению с нормальными здоровыми индивидуумами. У больных aHUS, получавших PE/PI, получены убедительные доказательства значительной, постоянной активации комплемента, воспаления сосудов, активации эндотелия, свертывания и повреждения почек. В то время как

PE/PI могут временно поддерживать нормальное количество тромбоцитов и LDH у некоторых больных, приведенные выше результаты показывают, что сохраняется постоянное нарушение регуляции комплемента и процессы ТМА. Несмотря на нормальные лабораторные показатели количества тромбоцитов, LDH и H_r, эти исследования показывают, что значительная постоянная активизация комплемента, воспаление сосудов, активация эндотелия, свертывание и повреждение почек существуют у больных aHUS.

ПРИМЕР 4. ВЛИЯНИЕ ПОСТОЯННОГО ЛЕЧЕНИЯ ЭКУЛИЗУМАБОМ НА БИОМАРКЕРЫ aHUS

КОНЦЕНТРАЦИИ

Изобретатели обнаружили, что постоянное лечение экулизумабом ингибирует повреждение почек, опосредуемое хронически повышенной активацией комплемента и терминального комплемента, и снижает воспаление, повреждение эндотелия и тромботический риск у больных aHUS. Например, постоянное лечение экулизумабом быстро и полностью ингибирует терминальную активацию комплемента, что выражается в снижении концентрации как C5a, так и sC5b-9 (например, C5a и sC5b-9 мочи). Смотри фиг. 20A-B. Исходно больные aHUS демонстрировали значительную терминальную активацию комплемента по сравнению с NHV, несмотря на применение PE/PI или нормальное количество тромбоцитов у некоторых больных. Действительно, больные aHUS продемонстрировали в 45 раз более высокие уровни C5a в моче и в 305 раз более высокие уровни sC5b-9 в моче по сравнению с NHV. Тем не менее, в процессе длительного лечения экулизумабом все больные aHUS продемонстрировали быструю и сильную блокаду терминального комплемента с полной нормализацией патогенных конечных продуктов активации комплемента и отсутствием разницы в уровнях по сравнению с NHV.

Кроме того, постоянное лечение экулизумабом нормализовало концентрацию белковых биомаркеров повреждения почек (фиг. 21A-C). До начала терапии экулизумабом большинство больных имели повышенные уровни биомаркеров: повреждения интерстиция трубочек и истощения функций почек (например, L-FABP-1 в ~48 раз выше,

чем у NHV), клубочковой фильтрации (например, цистатин С, в ~24 раза выше, чем у NHV), повреждения проксимальных канальцев (например, кластерин в 8,6 раза выше, чем у NHV). Тем не менее, постоянное лечение экулизумабом резко снизило концентрации в моче FABP-1 (на 100%), цистатина С (на 99%) и кластерина (на 98%). Это снижение было значимым во всех временных точках ($P < 0,0001$ для всех), и сниженная концентрация всех маркеров повреждения почек не отличалась от уровней у NHV. Дополнительные маркеры повреждения почек (например, TIMP-1 и $\beta 2$ -микроглобулин) также нормализовались (смотри выше в примере 2). Эти результаты предполагают, что ишемия и повреждение органа могут полностью зависеть от терминального комплемента и подтверждают клинические данные, демонстрирующие, что постоянное ингибирование системы ТМА, опосредуемой комплементом, ведет к клинически значимому улучшению eGFR и прекращению диализа.

Постоянное лечение экулизумабом также значительно снижает активацию альтернативного пути комплемента (смотри фиг. 22). Все больные aHUS продемонстрировали существенную системную активацию САР выше С5 с 5,5-кратным превышением уровней Ва по сравнению с NHV до лечения экулизумабом. Однако после начала лечения экулизумабом концентрации биомаркеров вышележащей активации САР (например, уровни Ва) снижались на 30%, и снижение через 4-6 недель было значимым во всех временных точках ($p < 0,005$) по сравнению с концентрацией маркеров у NHV. Тем не менее, уровни Ва не нормализовались у больных aHUS, получавших экулизумаб, предполагая, что активация САР сохраняется, отражая лежащее в основе нарушение регуляции комплемента у больных aHUS. Для ясности, тем не менее, блокада терминального комплемента экулизумабом защищала больных от клинических последствий продолжающейся активации САР.

Кроме того, хроническое лечение больных aHUS экулизумабом приводило к значительному снижению концентраций биомаркеров, связанных с воспалением, активацией эндотелия и повреждением тканей (фиг. 23A-C). Уровни sTNFR1 сыворотки были повышены (в

18,7 раза выше, чем уровни у NHV) у 100% больных aHUS на исходном уровне. Постоянное лечение экулизумабом значительно снижало sTNFR1 до 94%. Снижение концентрации этих биомаркеров через 4–6 недель было значимым во всех временных точках ($P < 0,0001$). Растворимый VCAM-1 и уровни TM были повышены у >95% больных aHUS на исходном уровне в 2 раза и 3,6 раза, соответственно, по сравнению с NHV, демонстрируя существенную активацию эндотелиальных клеток и повреждение до лечения экулизумабом. Концентрации TM и sVCAM-1 также значительно снижались во время лечения экулизумабом. Через 12–17 недель снижение концентрации биомаркеров повреждения эндотелия было значимым во всех временных точках (TM; $P < 0,0001$), но она все еще была умеренно повышенной по сравнению с NHV. Резко сниженные уровни растворимого TM могут отражать восстановление связанного с мембраной TM, который защищает от тромботического риска.

Наконец, хроническое лечение экулизумабом быстро и существенно снижало концентрацию биомаркеров, связанных с тромботическим риском и свертыванием (фиг. 24А–В). Концентрации биомаркеров свертывания F1+2 и D-димера были существенно увеличенными (в 5,5 раза и 9,8 раза выше, чем у NHV) на исходном уровне больше чем у 94% больных aHUS ($P < 0,0001$ и $P = 0,0002$, соответственно). Однако F1+2 и D-димер существенно снижались через 2,5 недели после начала лечения экулизумабом. Концентрация F1+2 снижалась на 88% ($P < 0,05$ для всех временных точек), а концентрация D-димера снижалась на 99% ($P < 0,0001$ для всех временных точек) при постоянном лечении экулизумабом. Тем не менее, эти два маркера оставались умеренно повышенными по сравнению с соответствующими концентрациями у нормальных здоровых индивидуумов.

РЕЗЮМЕ

Ввиду вышеизложенных данных авторы смогли сделать ряд выводов. Во-первых, у больных aHUS на исходном уровне были выявлены повышенные уровни всех биомаркеров тромботической микроангиопатии (ТМА) по сравнению с уровнями в образцах от нормальных здоровых добровольцев (NHV). Все группы больных,

включая больных, получающих PE/PI, или больных с нормальными тромбоцитами, H_h или LDH, больные aHUS демонстрировали существенное повышение по сравнению с NHVs при измерении: активации терминального компонента (в 45–305 раз выше, чем уровни у NHV); жизненно важного повреждения органа; альтернативного пути активации компонента (например, представленного в виде уровней Ba; в 5,5 раз более высоких, чем уровни у NHV); воспаления сосудов; активации и повреждения эндотелия и свертывания.

Постоянное лечение экулизумабом больных aHUS значительно уменьшало и нормализовало существенно повышенные маркеры активации терминального компонента. Ингибирование активации терминального компонента экулизумабом также существенно снижало и нормализовало маркеры повреждения органов. Вышележащие биомаркеры активации альтернативного пути также значительно снижались, но не нормализовались. А низкие уровни активации альтернативного пути сохранялись у больных, получавших лечение, отражая лежащее в основе нарушение регуляции компонента у больных aHUS. Тем не менее, данные ясно показывают, что блокада терминального компонента экулизумабом защищает больных aHUS от клинических последствий продолжающейся активации альтернативного пути.

Кроме того, постоянное лечение экулизумабом также приводило к: (i) существенному и стабильному снижению маркеров воспаления сосудов (вплоть до 94%); (ii) существенному ингибированию маркеров активации эндотелия (вплоть до 60%); (iii) существенному и стабильному снижению маркеров повреждения эндотелия (вплоть до 77%) до почти нормального уровня, демонстрируя четкую взаимосвязь между активацией терминального компонента и повреждением эндотелия; и (iv) выраженному снижению (вплоть до 99%) концентрации биомаркеров тромботического риска, вероятно, уменьшая возможность образования сгустка и тем самым уменьшая частоту ТМА у этих больных. Изобретатели заключают, не будучи связанными какой-либо теорией или механизмом действия, что ингибирование активации терминального компонента экулизумабом должно быть

постоянным, так как потеря ингибирования терминального компонента при aHUS будет приводить к быстрому росту опасно повышающейся активации терминального компонента, впоследствии приводящей к: увеличению лежащей в основе субклинической активации эндотелия, значительному ускорению повреждения эндотелия, заметному росту тромботического риска и раннему и постоянному риску катастрофической сосудистой ишемии и повреждения жизненно важных органов. Кроме того, эти данные указывают на то, что повреждение почек, воспаление сосудов и повреждение и активация эндотелия в целом или частично зависят от активности терминального компонента, чья активность эффективно и безопасно ингибируется при использовании экулизумаба.

Хотя настоящее раскрытие описано со ссылкой на конкретные варианты его осуществления, специалистам в данной области техники следует понимать, что могут быть сделаны различные изменения, и варианты осуществления могут быть заменены на эквиваленты без отхода от истинной сущности и объема раскрытия. Кроме того, многие модификации могут быть сделаны для адаптации конкретной ситуации, веществ, композиций веществ, способа, или стадии или стадий способа в целях сущности и объема настоящего изобретения. Все такие модификации рассматриваются как входящие в пределы объема раскрытия.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS) у индивидуума-человека, включающий:

(a) определение концентрации VCAM-1 в биологической жидкости, полученной от индивидуума, у которого есть подозрение на наличие или риск развития aHUS; и

(b) введение индивидууму эффективного количества ингибитора C5 комплемента с частотой, достаточной для снижения концентрации VCAM-1 по сравнению с концентрацией в образце биологической жидкости того же типа, полученного от индивидуума до лечения.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий:

(a) определение концентрации по меньшей мере одного другого белкового биомаркера, связанного с aHUS, в биологической жидкости, полученной от индивидуума, где по меньшей мере один другой белковый биомаркер, связанный с aHUS, выбран из группы, состоящей из: CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , IL-6, протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента, растворимого C5b9 (sC5b9), фрагмента F1+2 протромбина, d-димера, тромбомодулина, фактора фон Виллебранда (vWF), компонента C5a комплемента, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина С, NAG, TIMP-1, NGAL, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), альбумина, CXCL9, KIM-1; и

(b) введение субъекту эффективного количества ингибитора C5 комплемента с частотой, достаточной для снижения концентраций VCAM-1 и, по меньшей мере, одного другого белкового биомаркера, связанного с aHUS, по сравнению с концентрациями в образце биологической жидкости того же типа, полученного от субъекта до лечения.

3. Способ лечения индивидуума с атипичным гемолитическим уремическим синдромом (aHUS), включающий:

(1) определение концентрации по меньшей мере двух белковых биомаркеров, связанных с aHUS, в образце от индивидуума, где по меньшей мере два белковых биомаркера, связанные с aHUS, выбраны

из группы, состоящей из растворимого рецептора 1 фактора некроза опухоли (sTNFR1), IL-6, протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента, растворимого C5b9 (sC5b9), фрагмента F1+2 протромбина, d-димера, тромбомодулина, компонента C5a комплемента, β 2-микроглобулина (β 2M), кластерина, цистатина С, белка 1, связывающего жирные кислоты (FABP-1), растворимого лиганда CD40 (sCD40L), фактора роста клеток эндотелия сосудов (VEGF), лиганда хемокина 9 (мотив С-Х-С), лиганда хемокина 10 (мотив С-Х-С), белка-1 хемотаксиса моноцитов, молекулы-1 адгезии клеток сосудов и тканевого ингибитора металлопротеазы-1; и

(2) если концентрации по меньшей мере двух белковых биомаркеров, связанных с aHUS в образце повышены по сравнению с нормальными контрольными образцами того же типа, то индивидууму вводят, по меньшей мере 900 мг ингибитора C5 комплемента каждую неделю в течение двух или более недель, с последующим введением по меньшей мере 1200 мг ингибитора комплемента C5, по меньшей мере, каждые 12 дней.

4. Способ лечения комплемент-опосредованной тромботической микроангиопатии (ТМА) у индивидуума-человека, включающий:

(a) определение концентрации FABP-1, цистатина С и/или кластерина в биологической жидкости, полученной от индивидуума; и

(b) введение индивидууму эффективного количества ингибитора комплемента C5 с частотой, достаточной для снижения концентрации(й) FABP-1, цистатина С и/или кластерина по сравнению с концентрацией(ями) в образце биологической жидкости того же типа, полученной от индивидуума до лечения.

5. Способ по п.4, где биологической жидкостью является моча.

6. Способ по любому из пп.1-5, где ингибитор комплемента C5 представляет собой:

(i) малую молекулу, полипептид, аналог полипептида, пептидомиметик или аптамер, необязательно, выбранный из группы, состоящей из MB12/22, MB12/22-RGD, ARC187, ARC1905, SSL7 и OmC1;

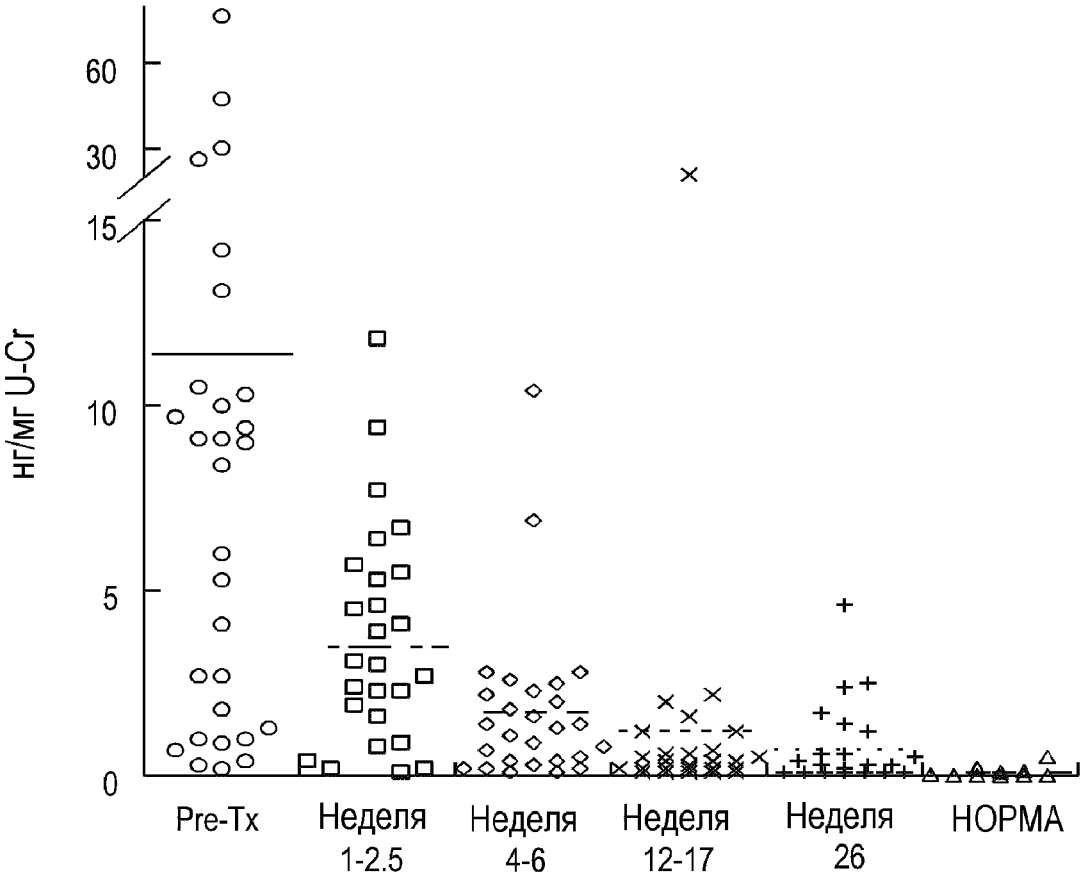
(ii) антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, необязательно, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбран из гуманизированного антитела, рекомбинантного антитела, диатела, химеризованного или химерного антитела, моноклонального антитела, деиммунизированного антитела, полностью человеческого антитела, одноцепочечного антитела, фрагмента Fv, фрагмента Fd, фрагмента Fab, фрагмента Fab' и фрагмента F(ab')₂; или

(iii) антитела или его антиген-связывающего фрагмента, который связывается с компонентом комплемента C5 и ингибирует расщепление C5 на фрагменты C5a и C5b, такие как антитела экулизумаб или антиген-связывающий фрагмент пекселезумаб.

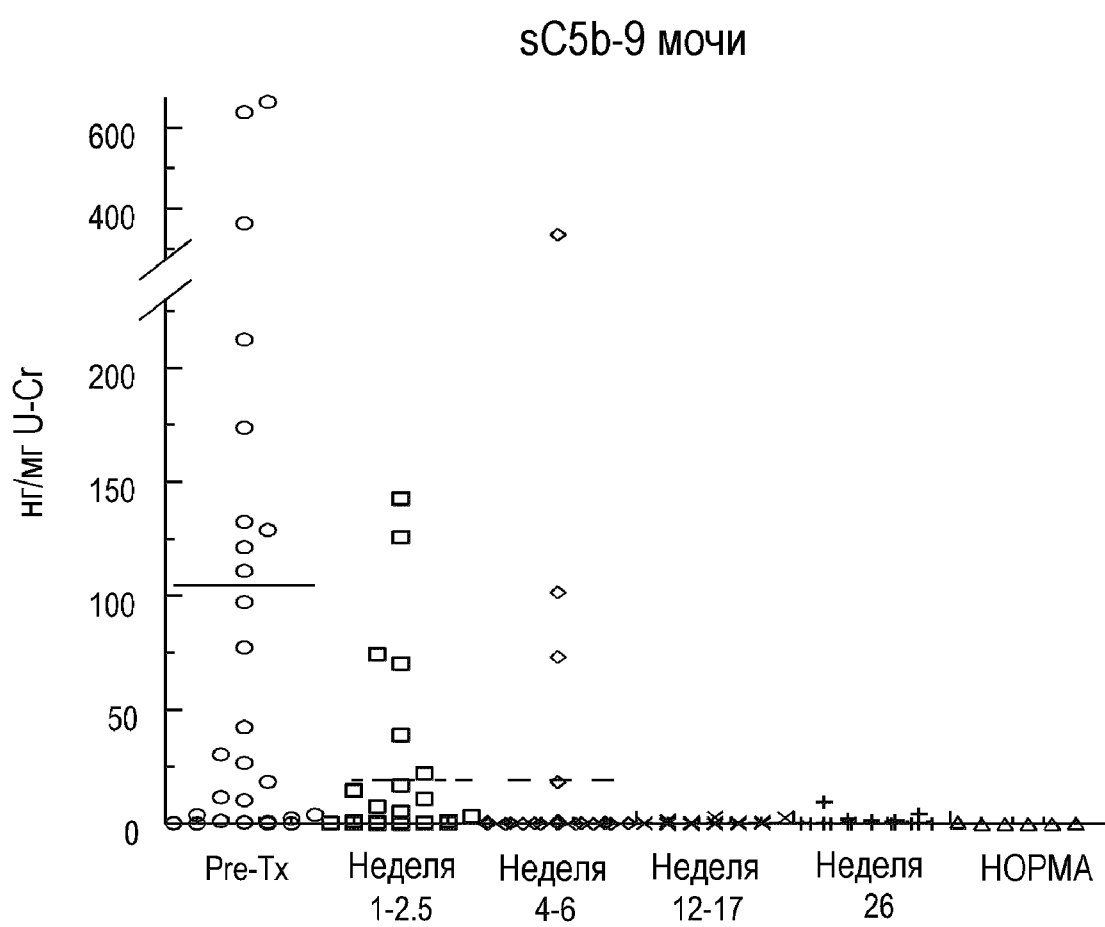
7. Способ по любому из пп.1-5, где ингибитор комплемента C5 представляет собой экулизумаб.

По доверенности

C5a мочи

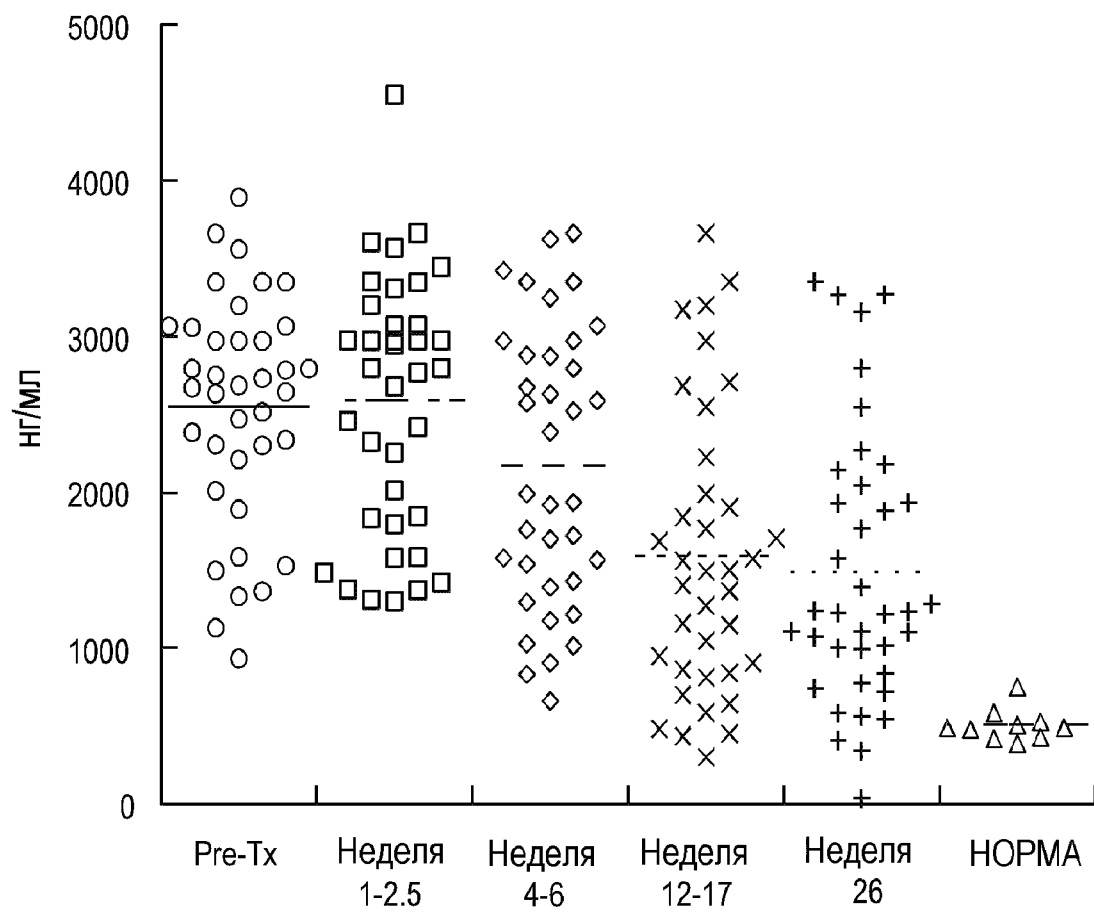


ФИГ.1А

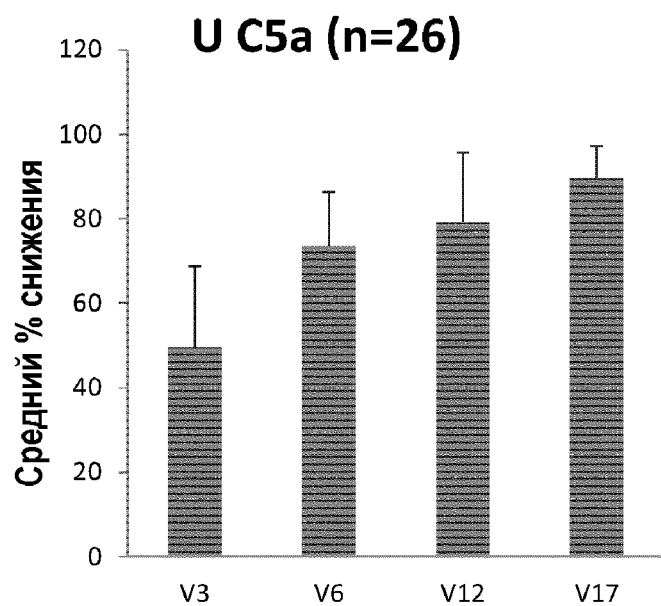


ФИГ.1В

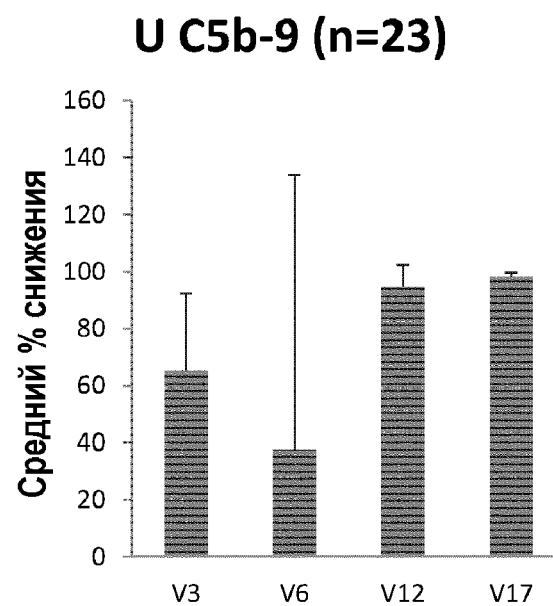
Уровни Ва в плазме



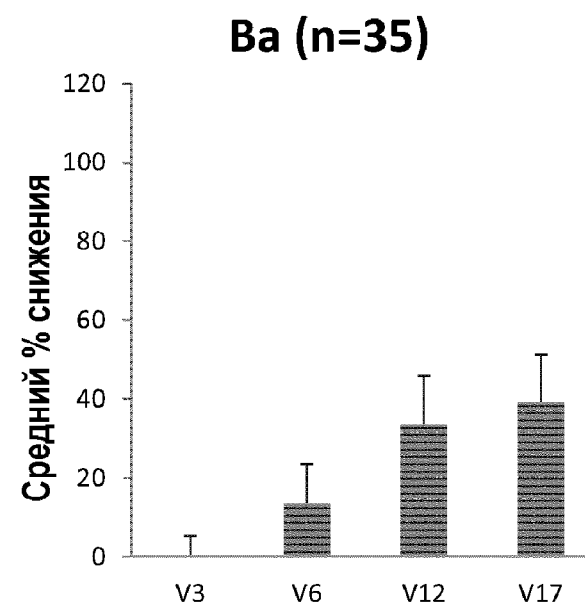
ФИГ.1С



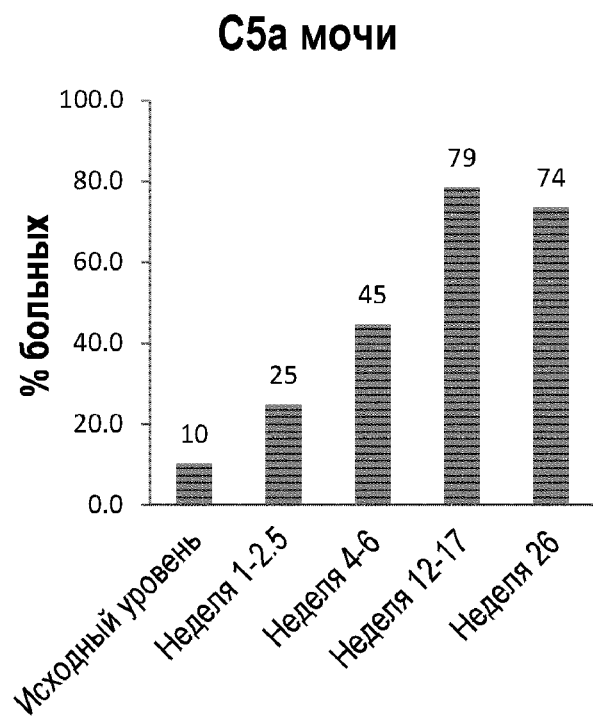
ФИГ.1D



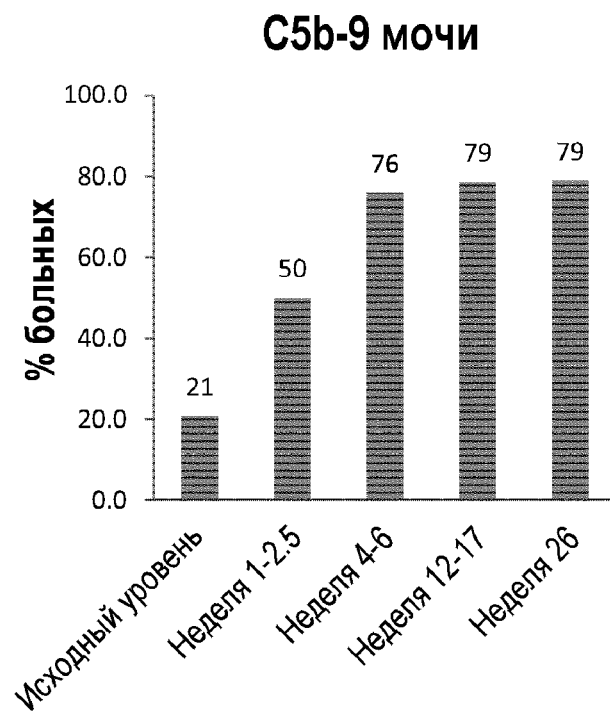
ФИГ.1E



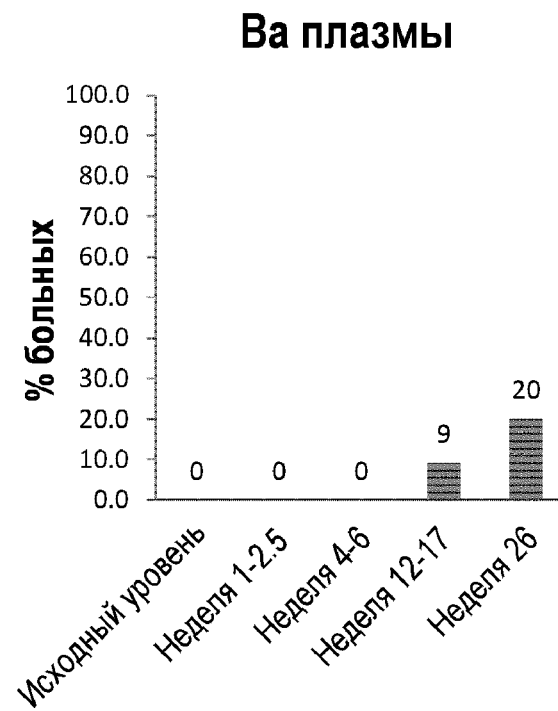
ФИГ.1F



ФИГ.2А

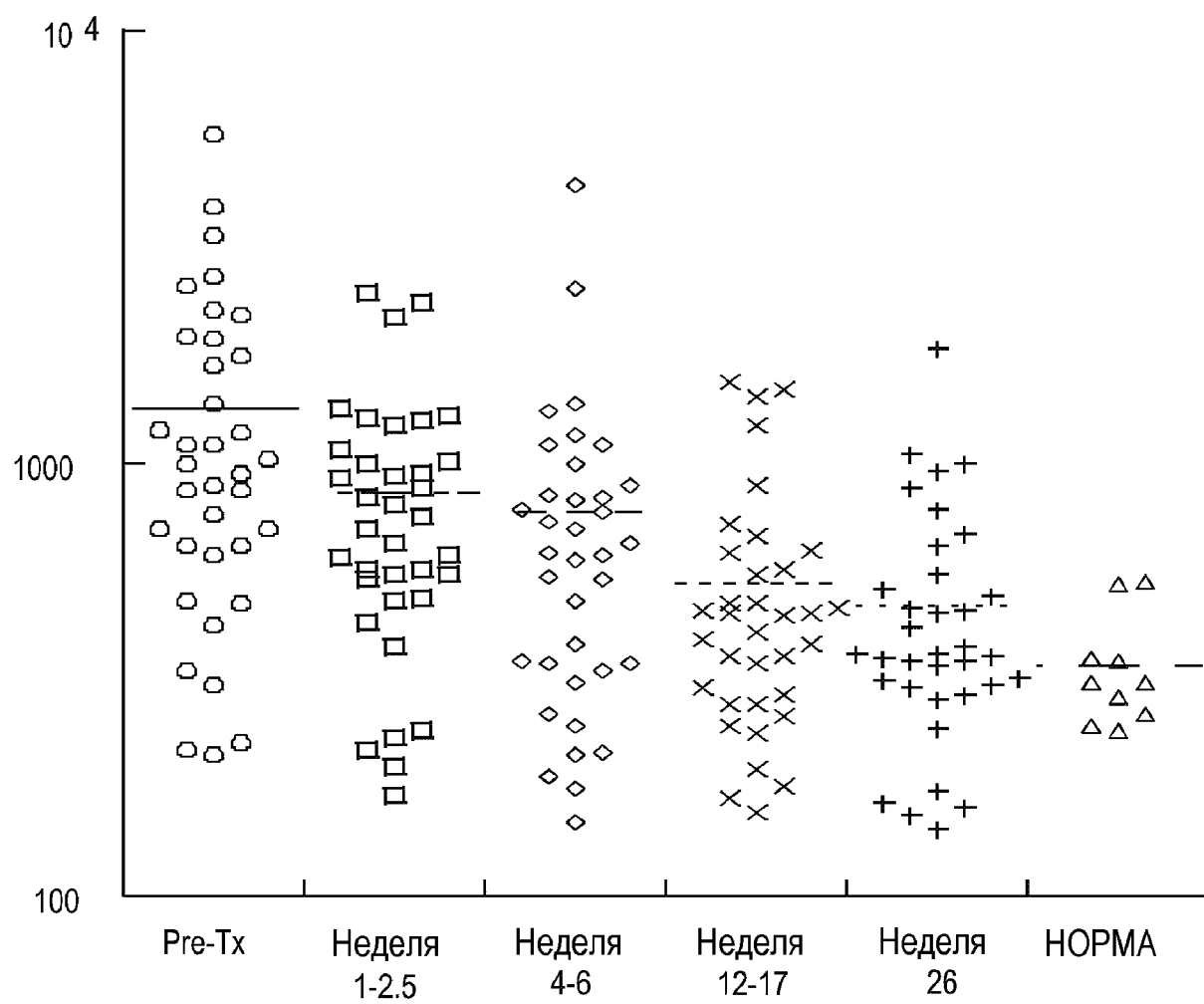


ФИГ.2В



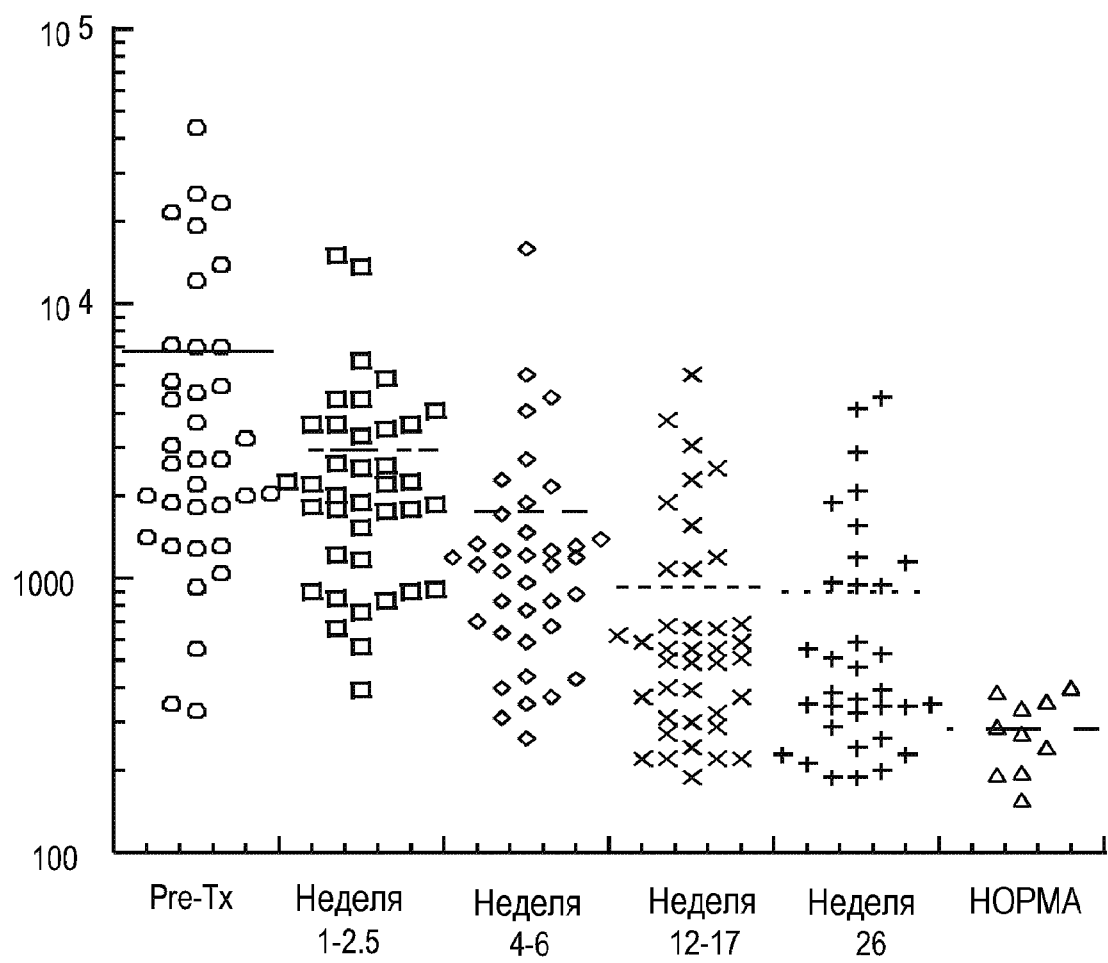
ФИГ.2С

Уровни F1+2 в плазме

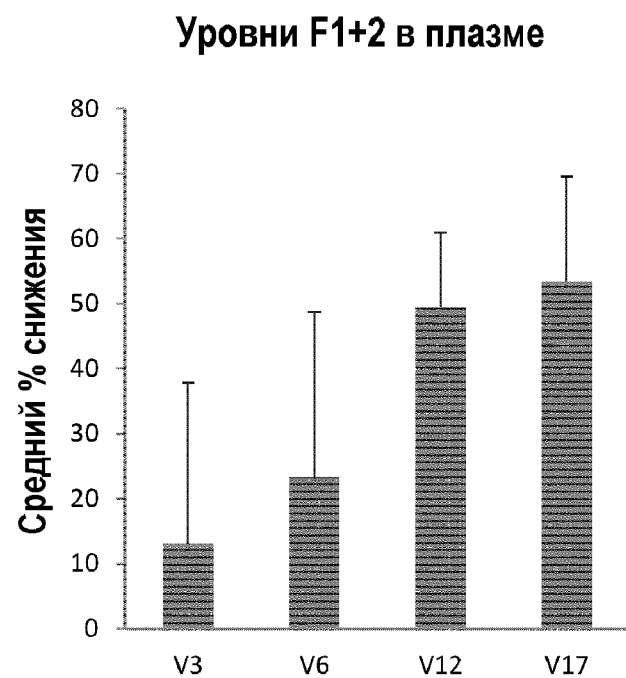


ФИГ.3А

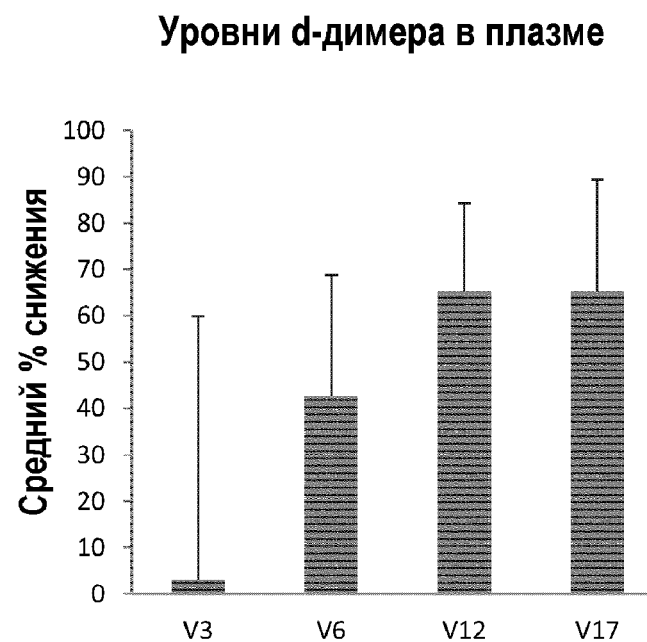
Уровни d-димера в плазме



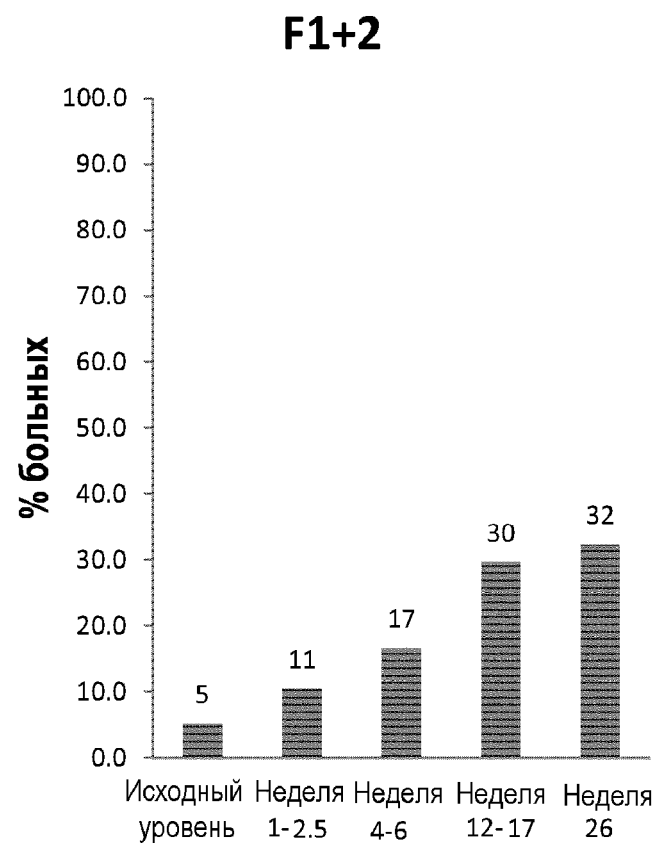
ФИГ.3В



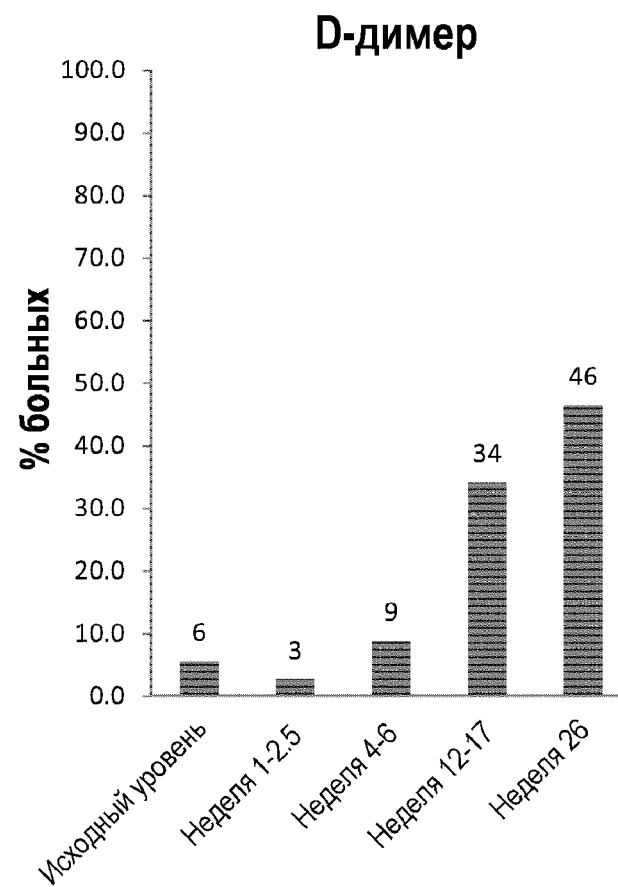
ФИГ.3С



ФИГ.3D

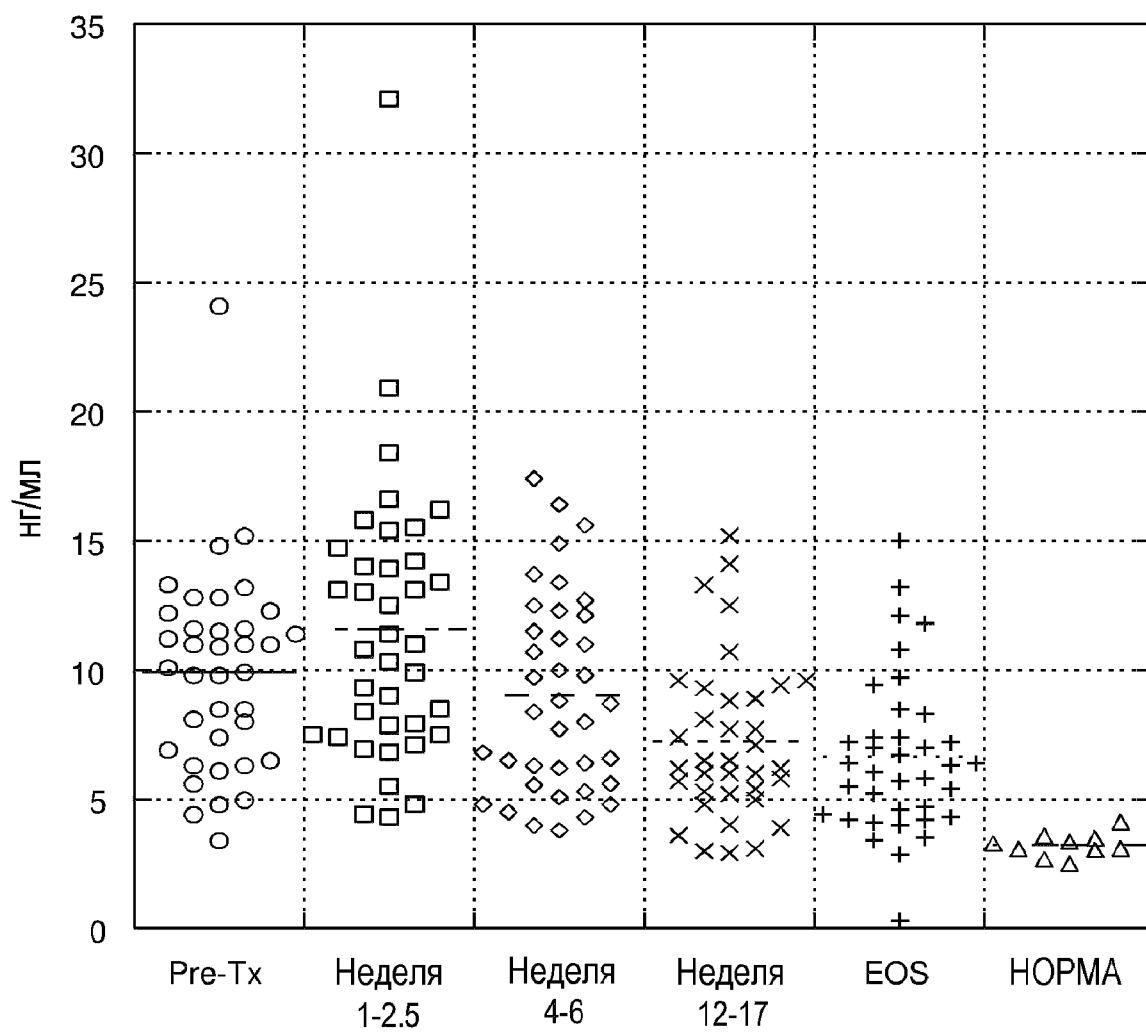


ФИГ.4А

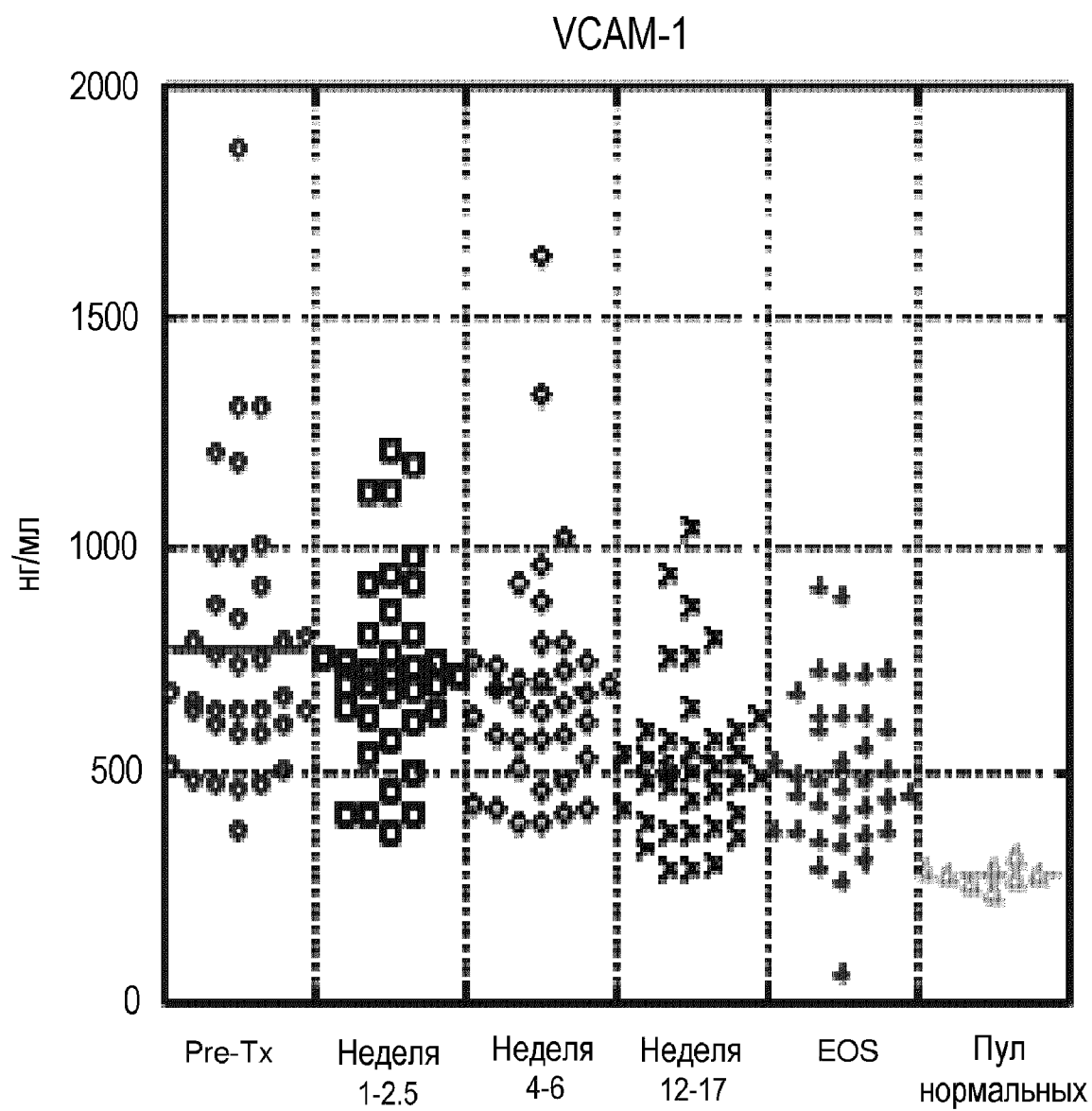


ФИГ.4В

ТМ в ЭДТА-плазме

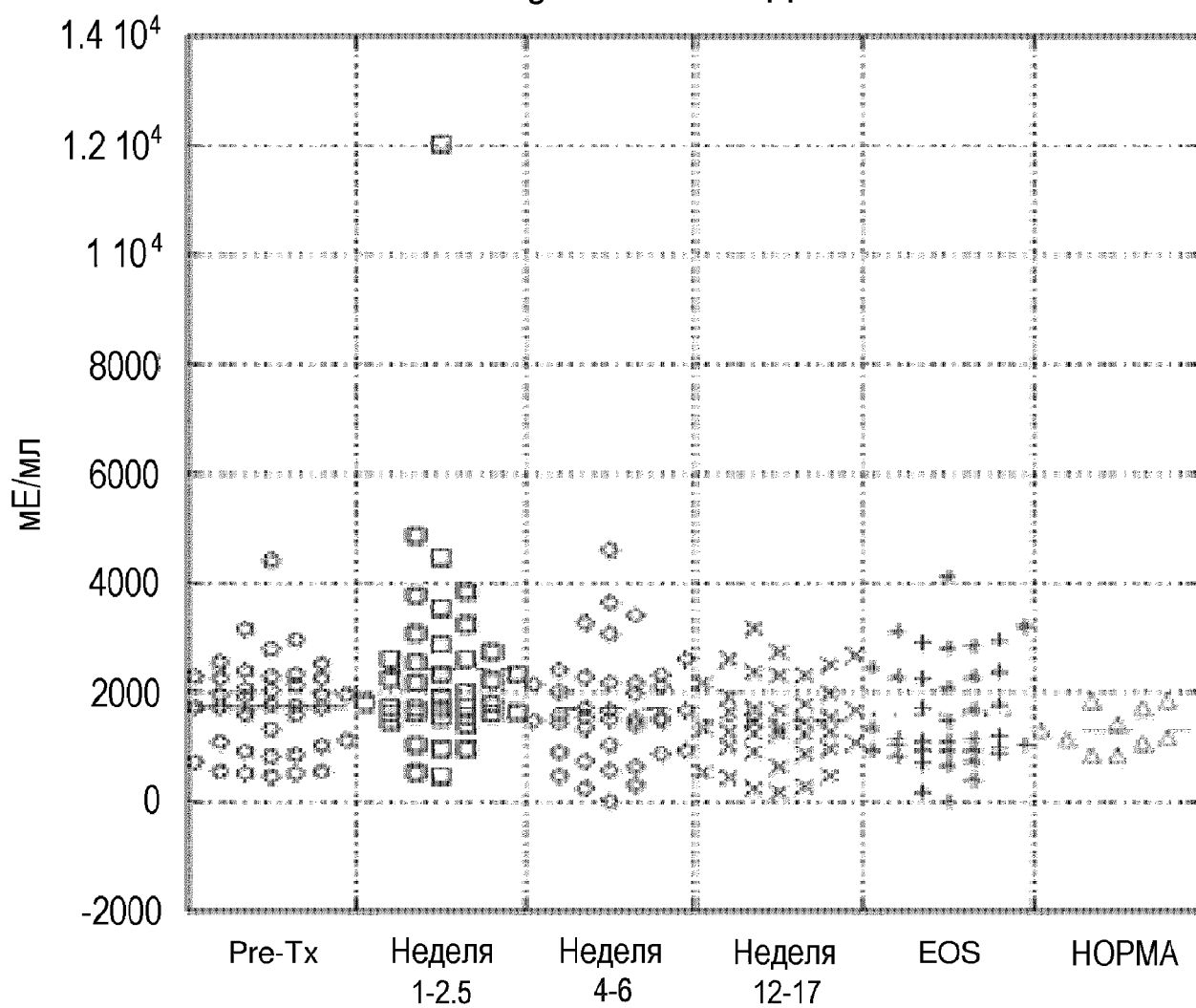


ФИГ.5А



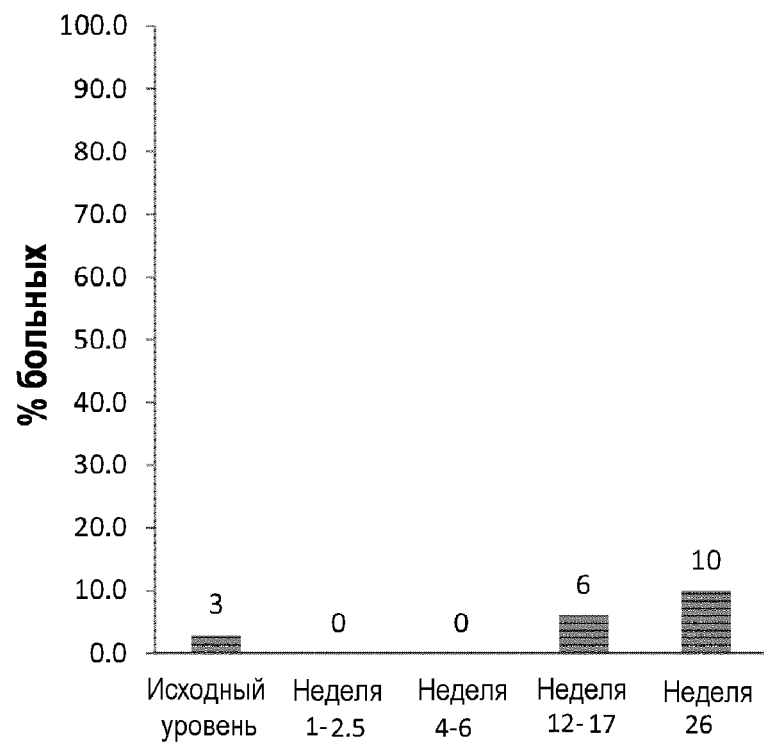
ФИГ.5В

vWF ag в C10-004 ЭДТА-плазме



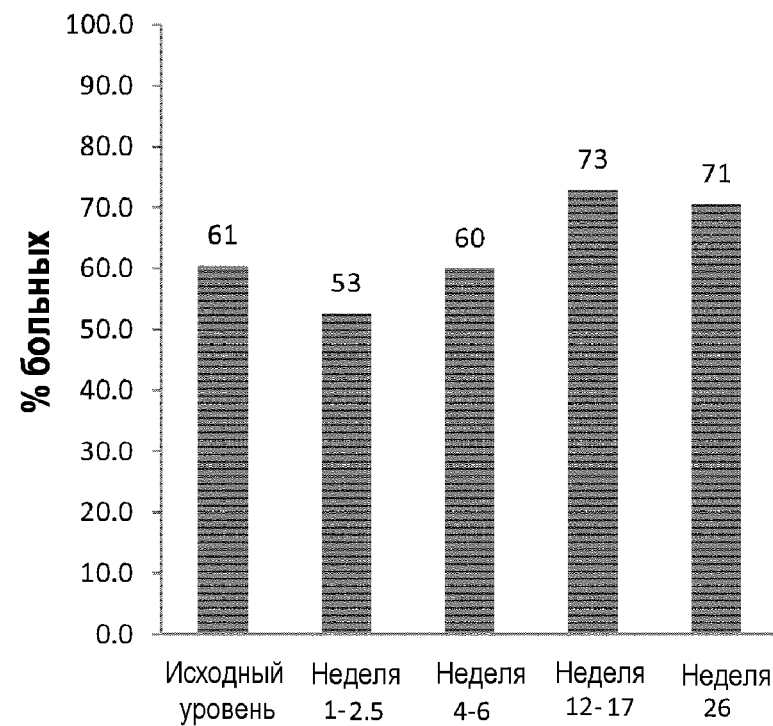
ФИГ.5С

TM

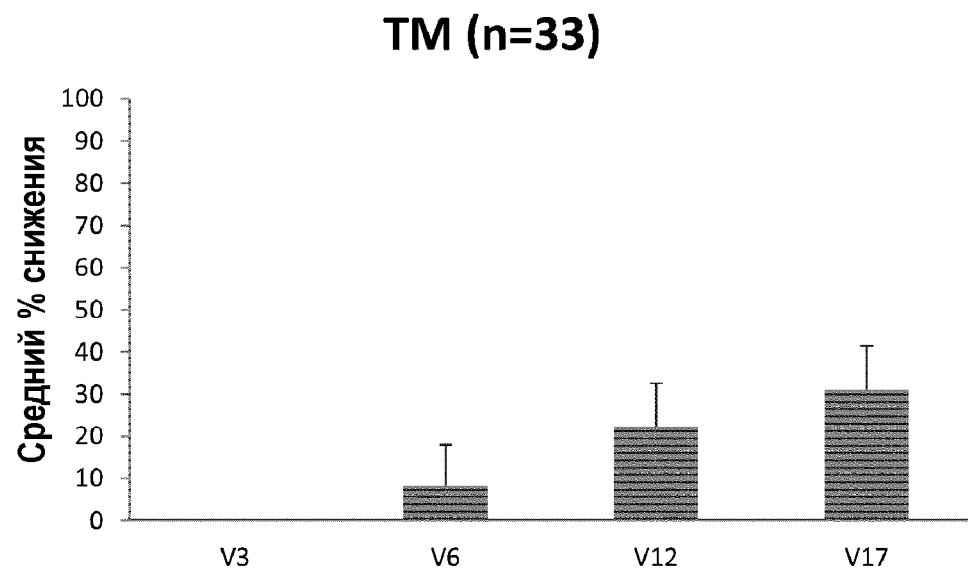


ФИГ.6А

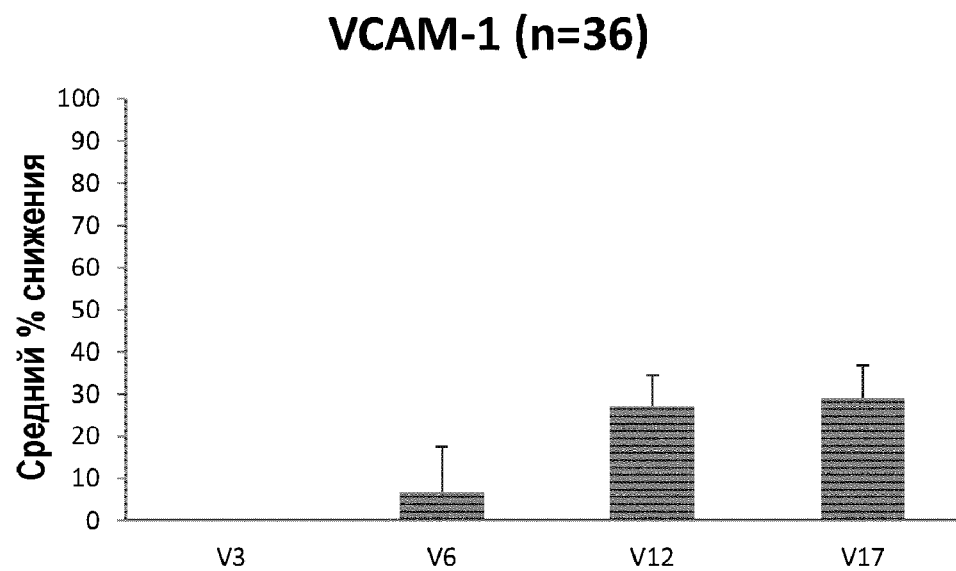
Фактор фон Виллебранда



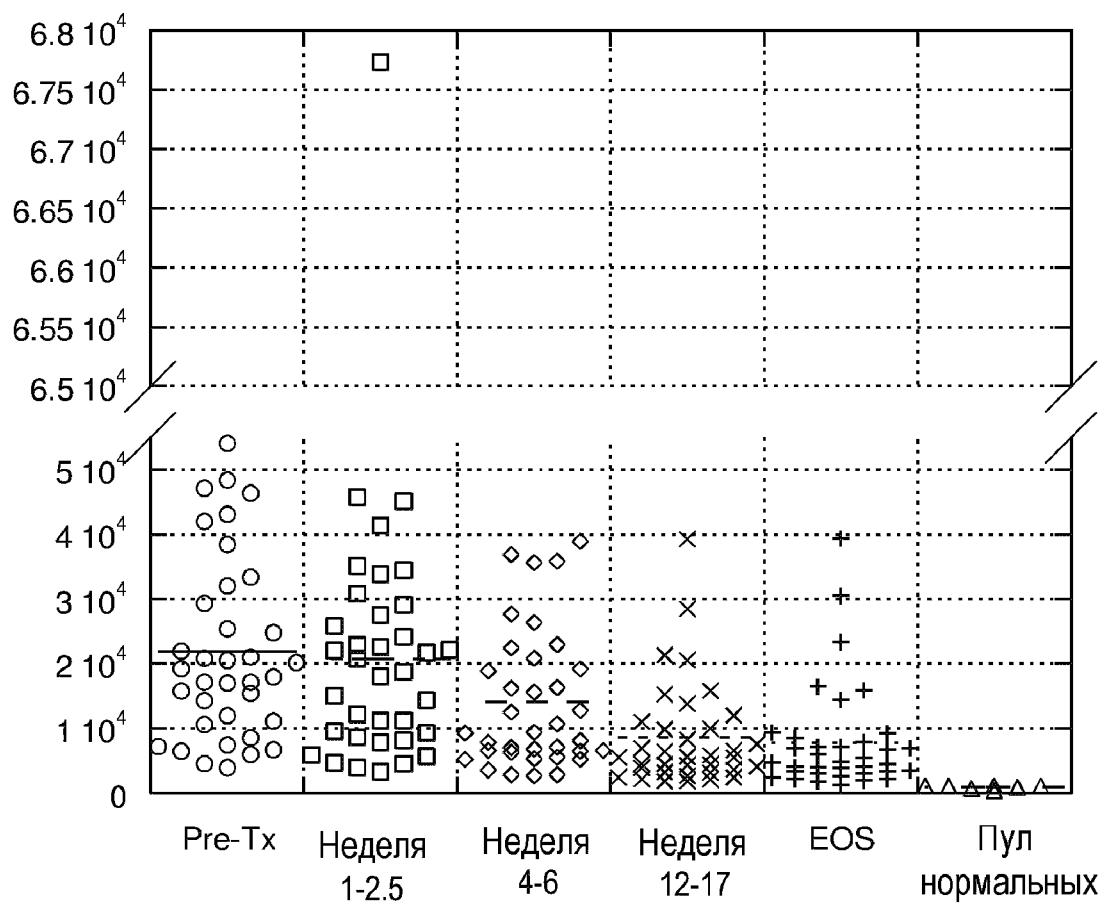
ФИГ.6В



ФИГ.6С

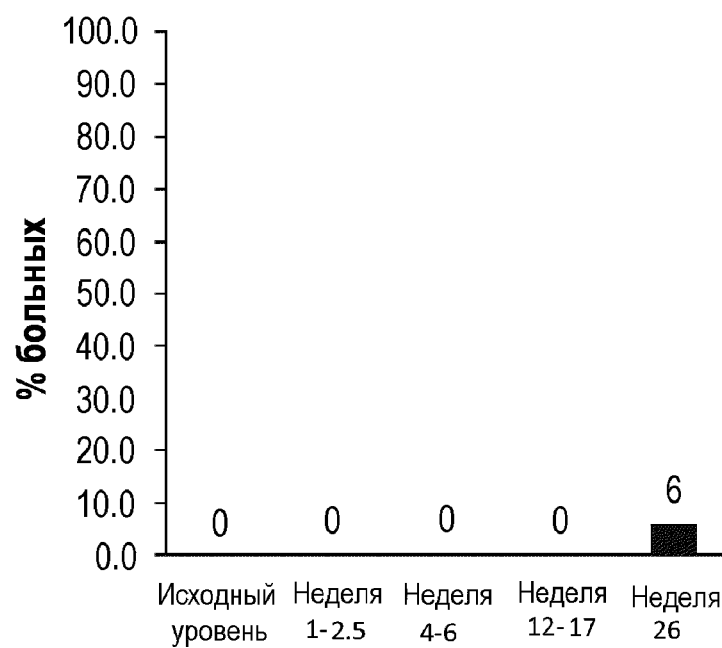


ФИГ.6D



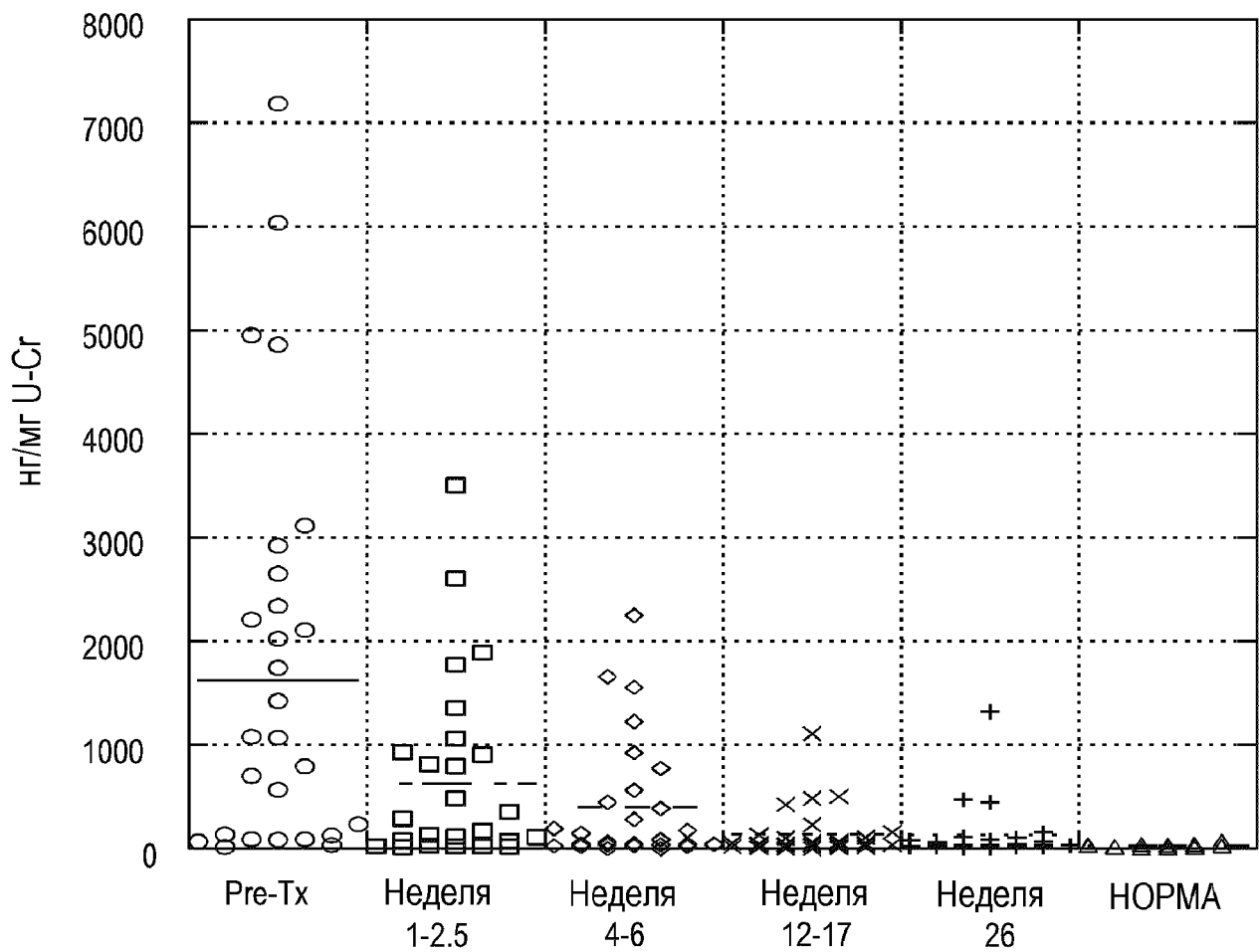
ФИГ.7А

Нормализация TNFR1

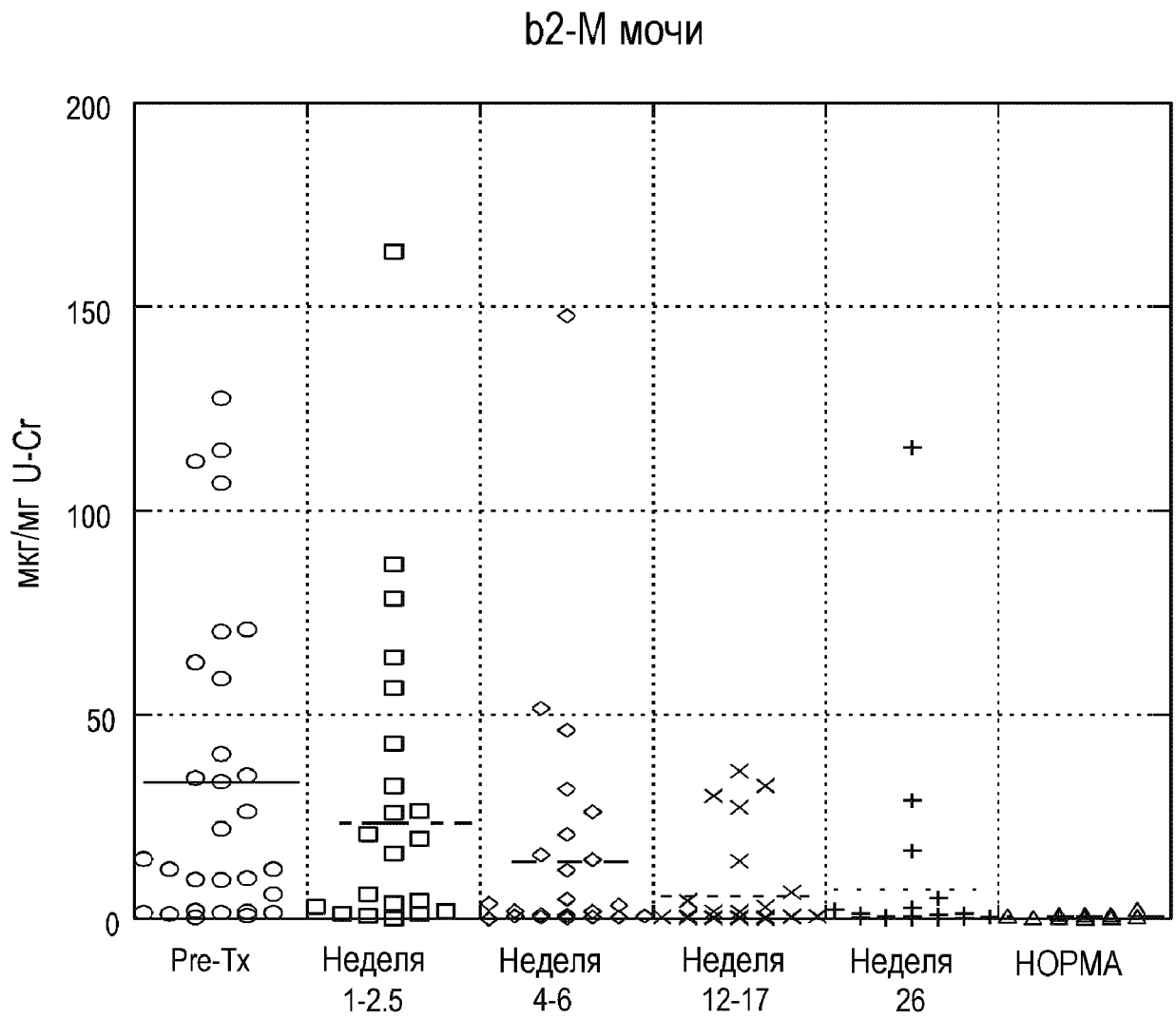


ФИГ.7В

Сус С мочи

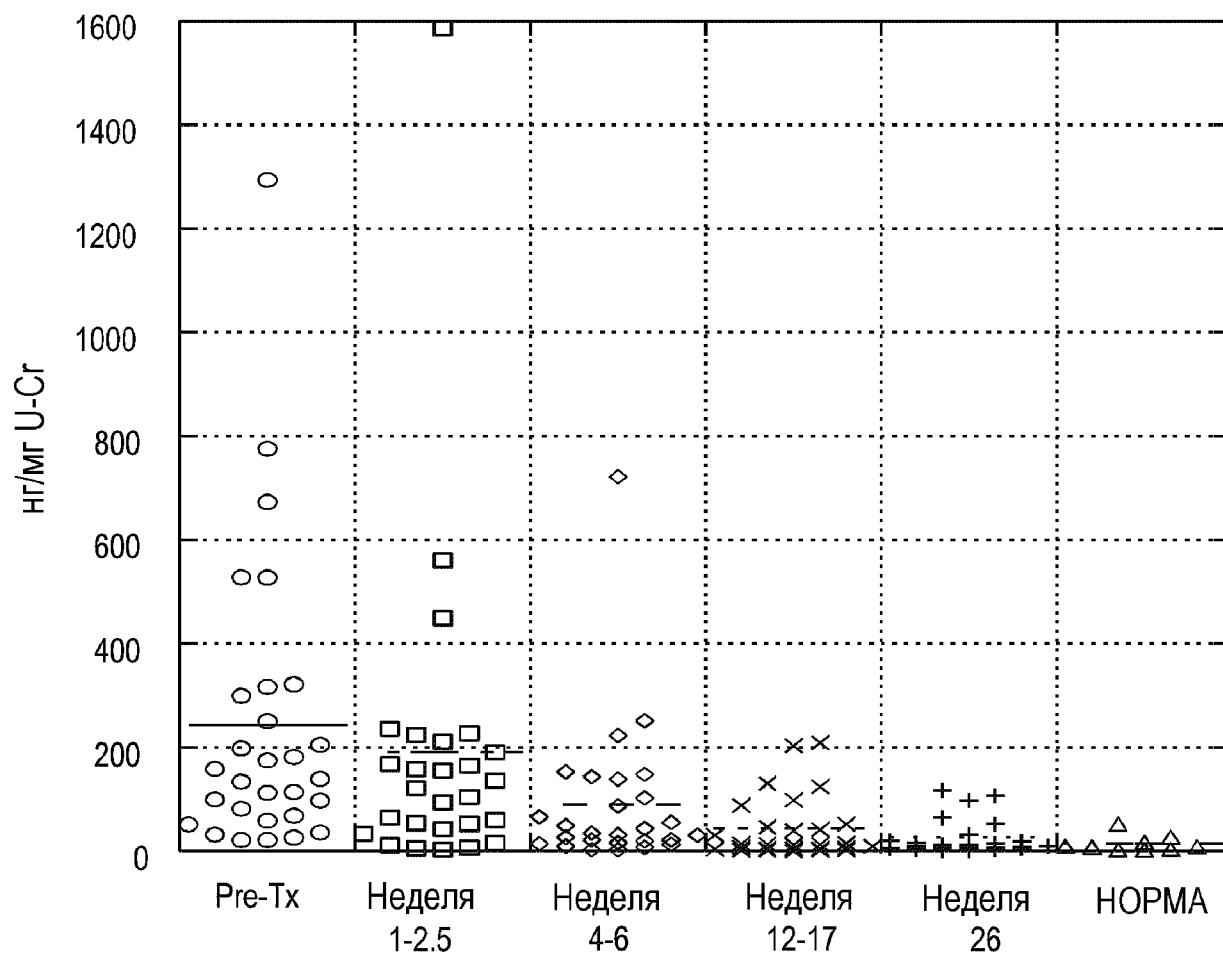


ФИГ.8А

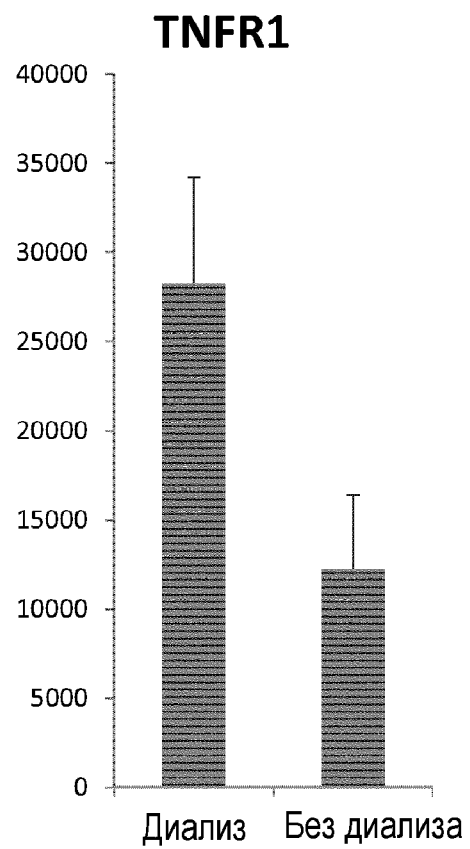


ФИГ.8В

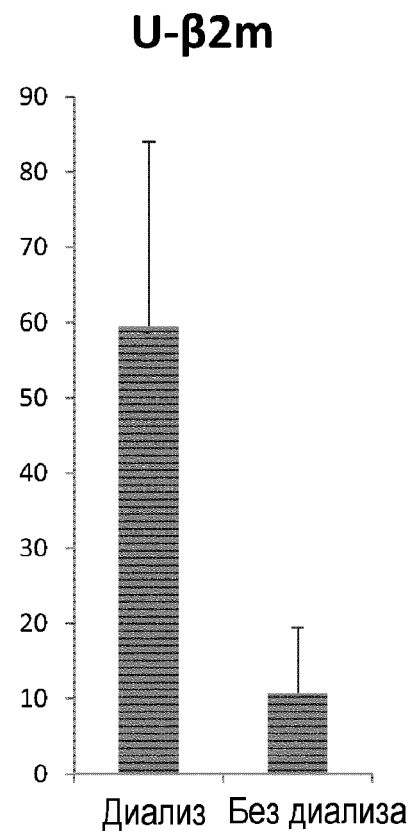
NGAL мочи



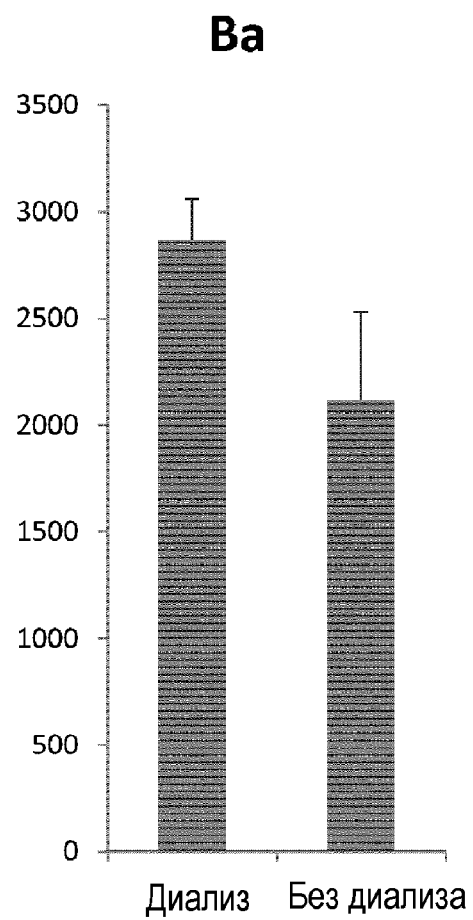
ФИГ.8С



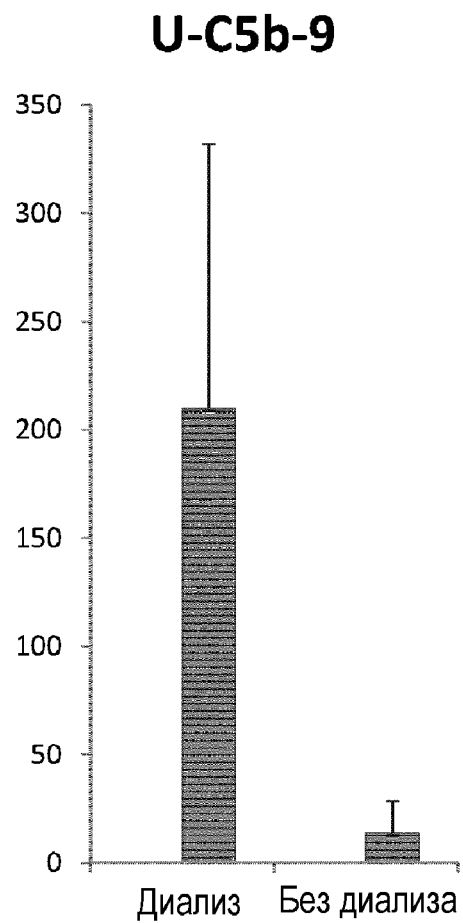
ФИГ.9А



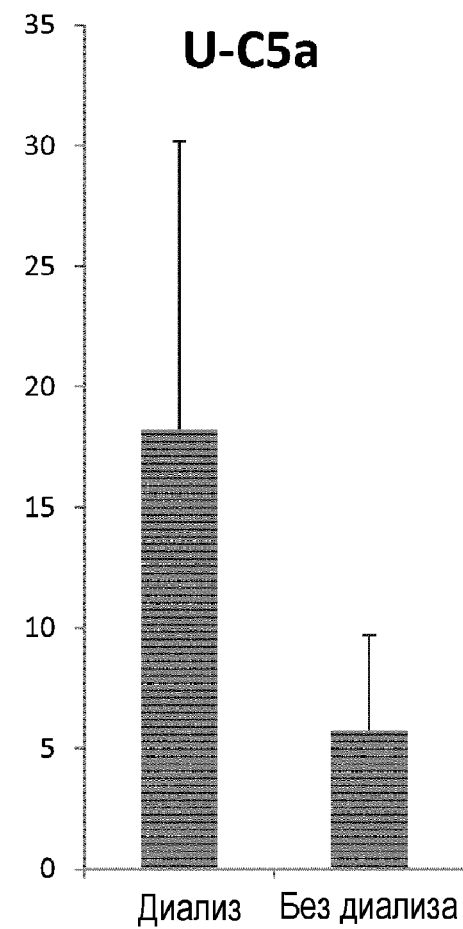
ФИГ.9В



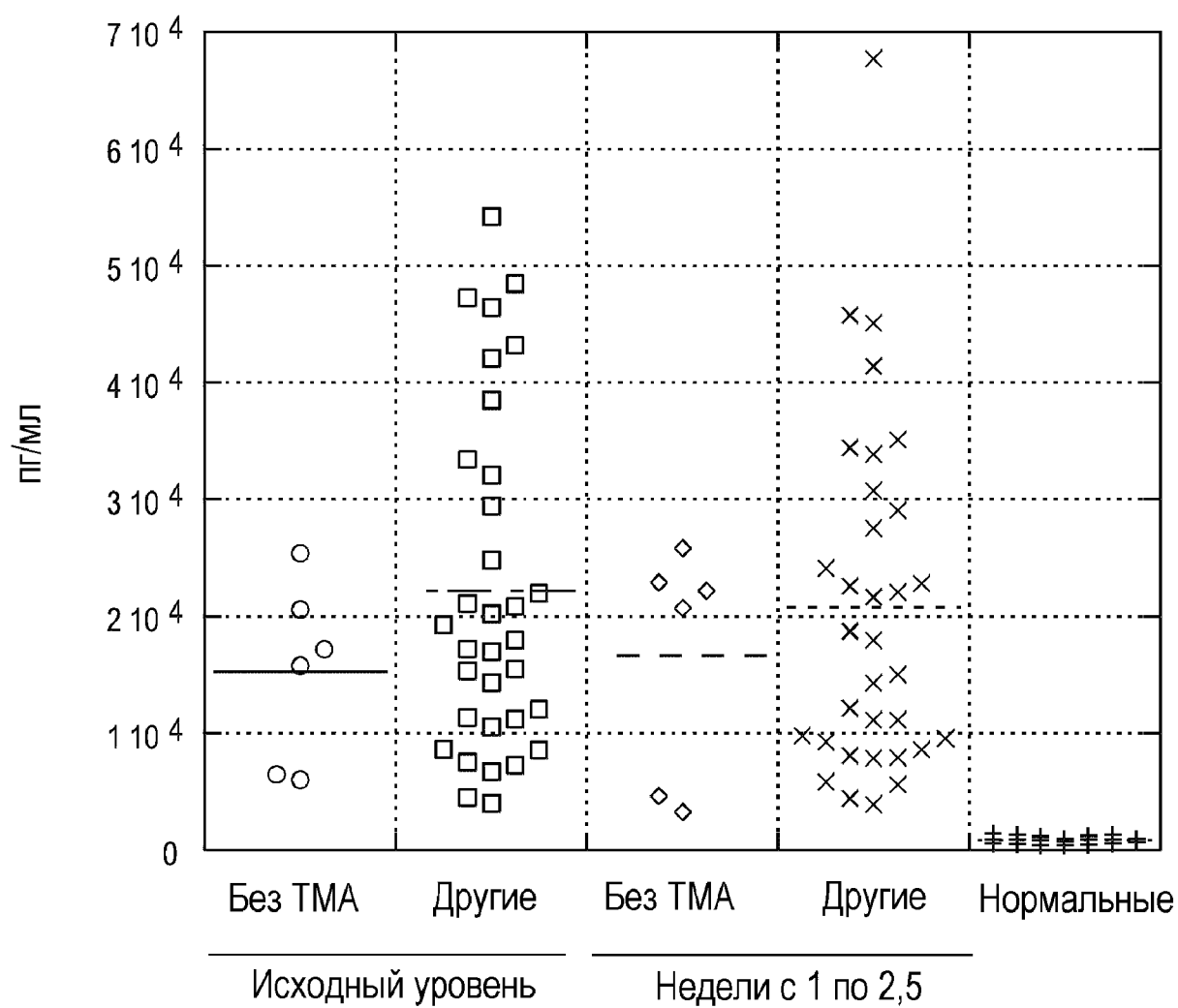
ФИГ.9С



ФИГ.9D



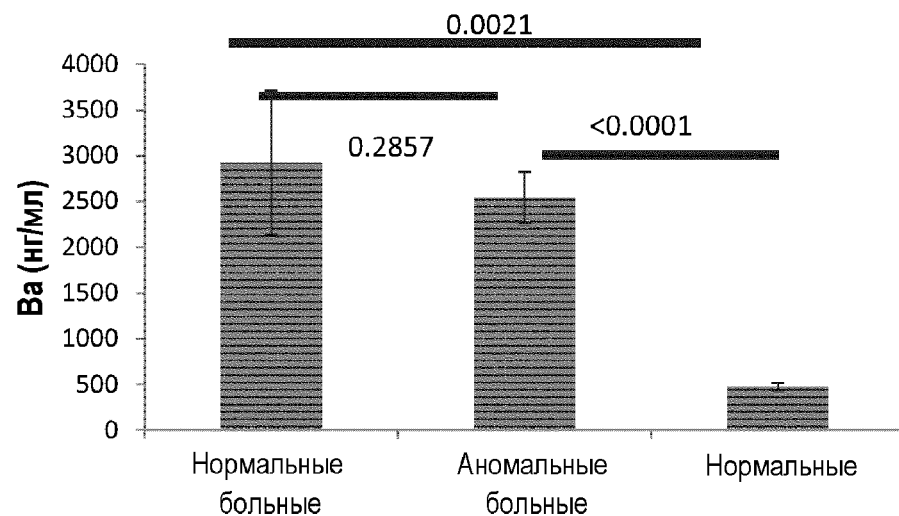
ФИГ.9Е



ФИГ.10А

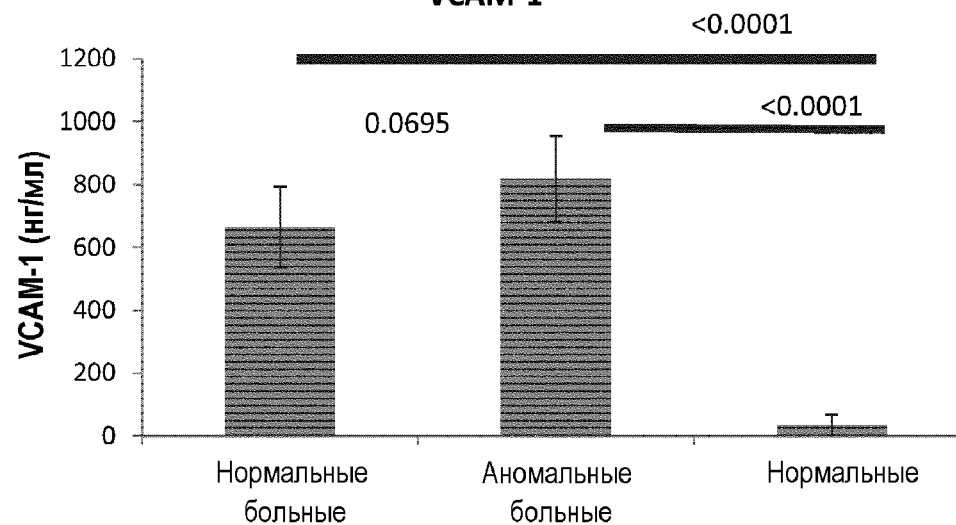
ФИГ.10В

Ba



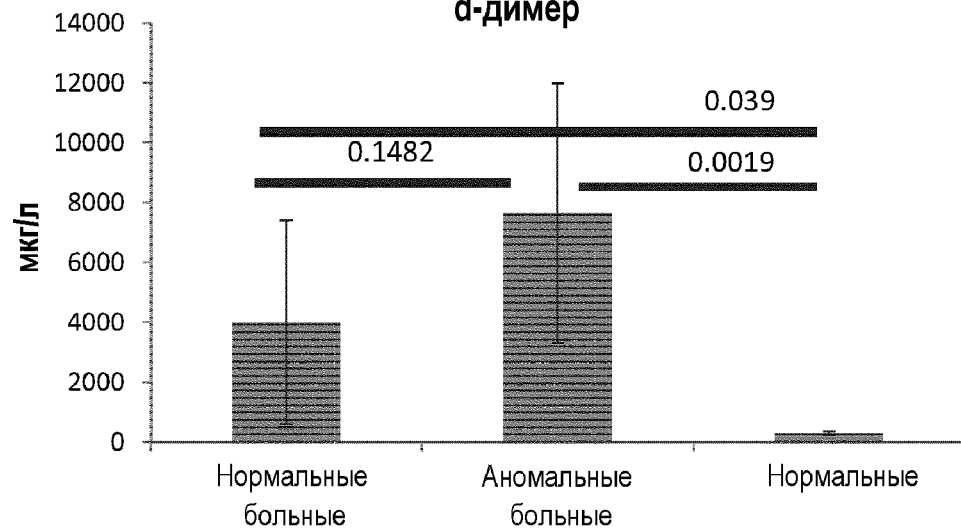
ФИГ.10С

VCAM-1



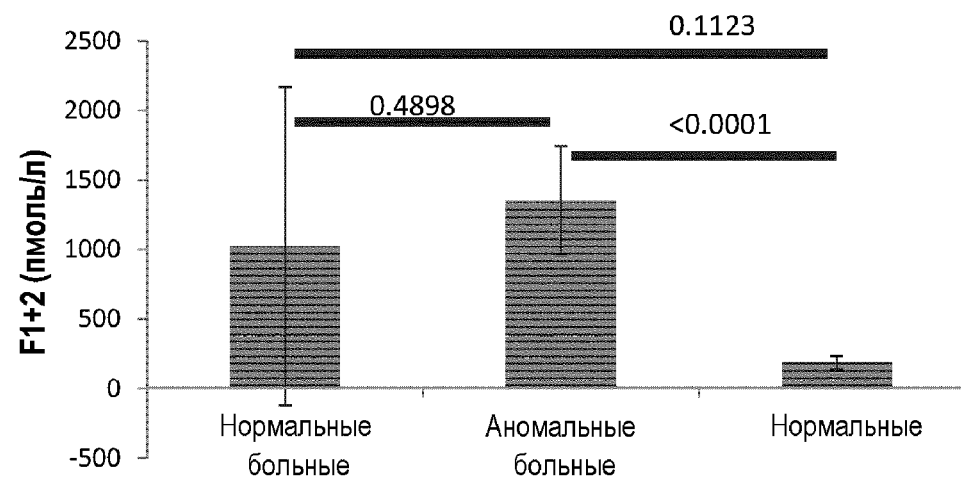
ФИГ.10D

d-димер



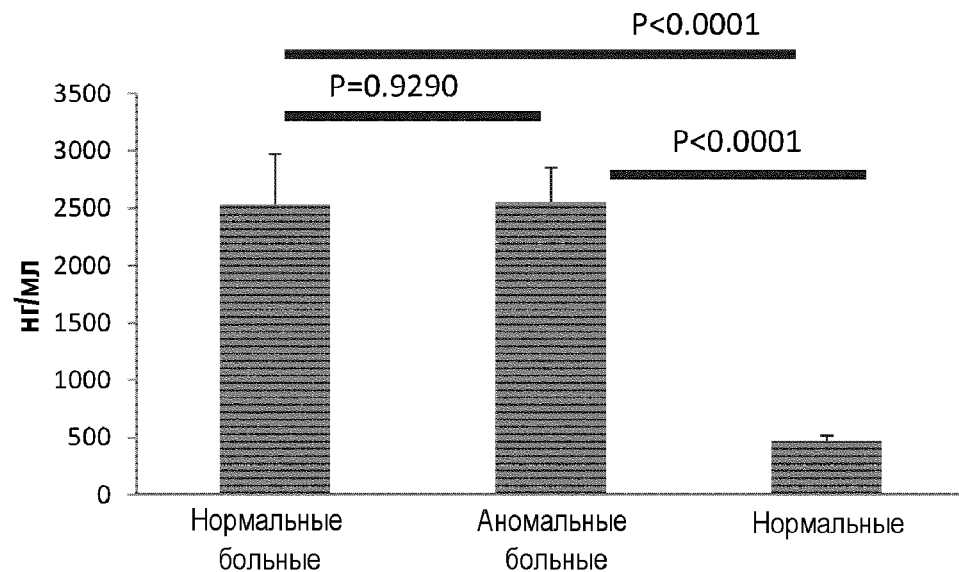
ФИГ.10Е

F1+2



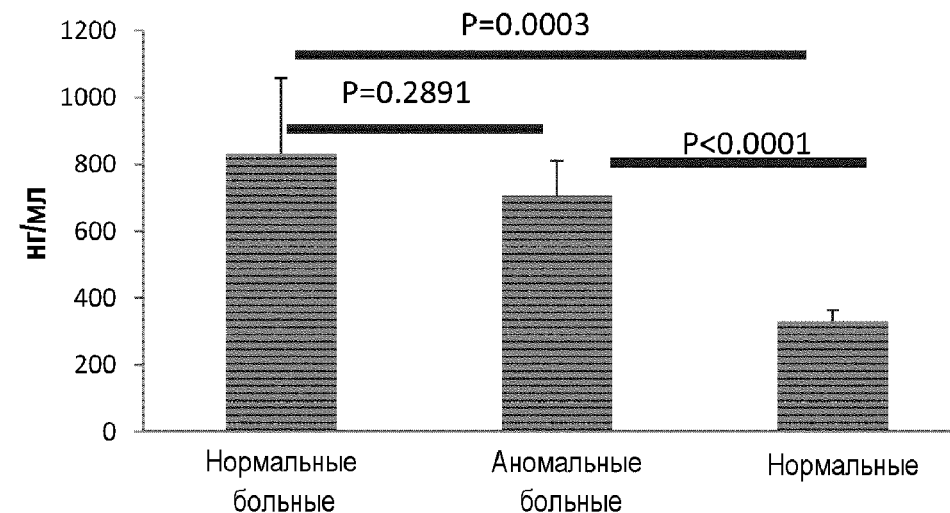
ФИГ.10F

Ва плазмы



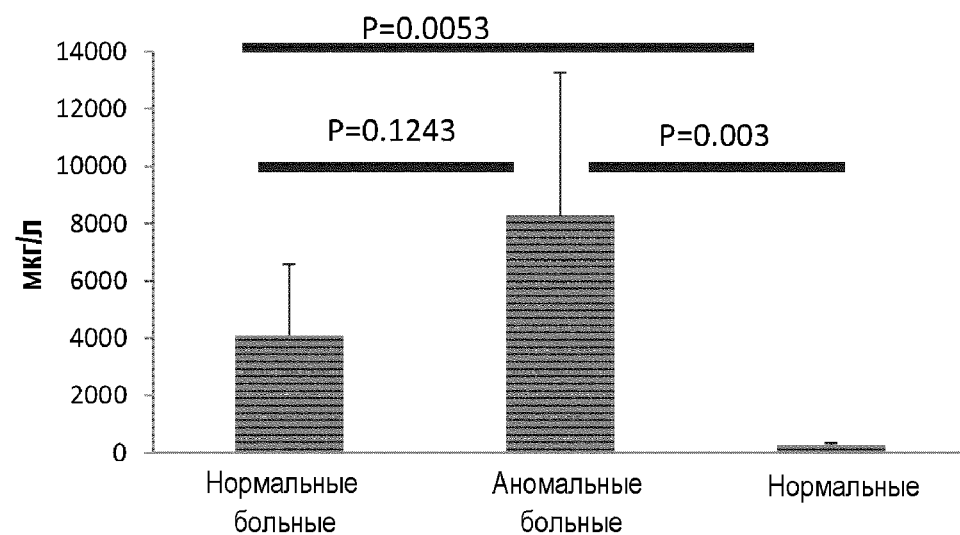
ФИГ.10G

VCAM-1



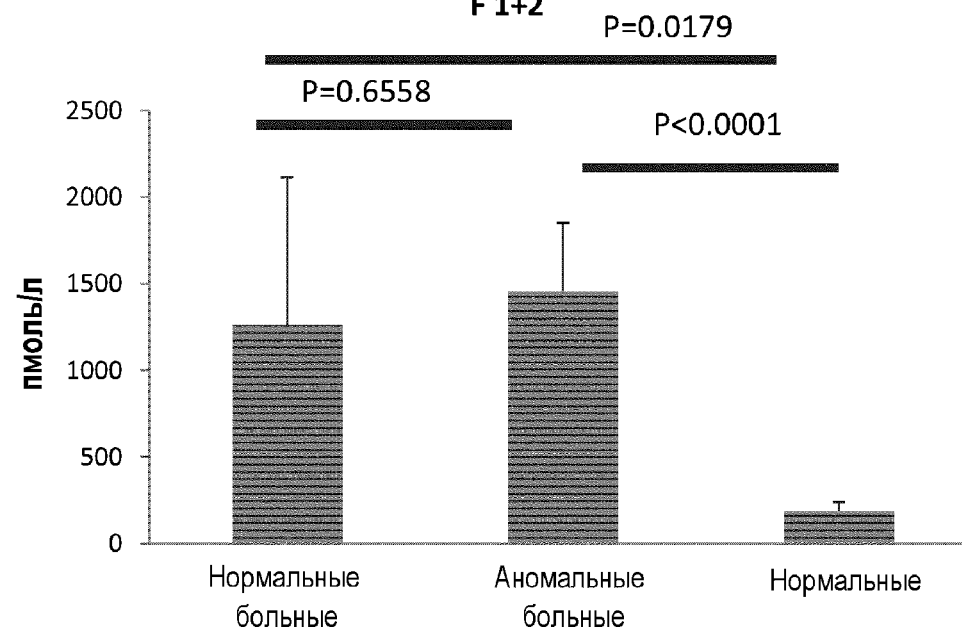
ФИГ.10H

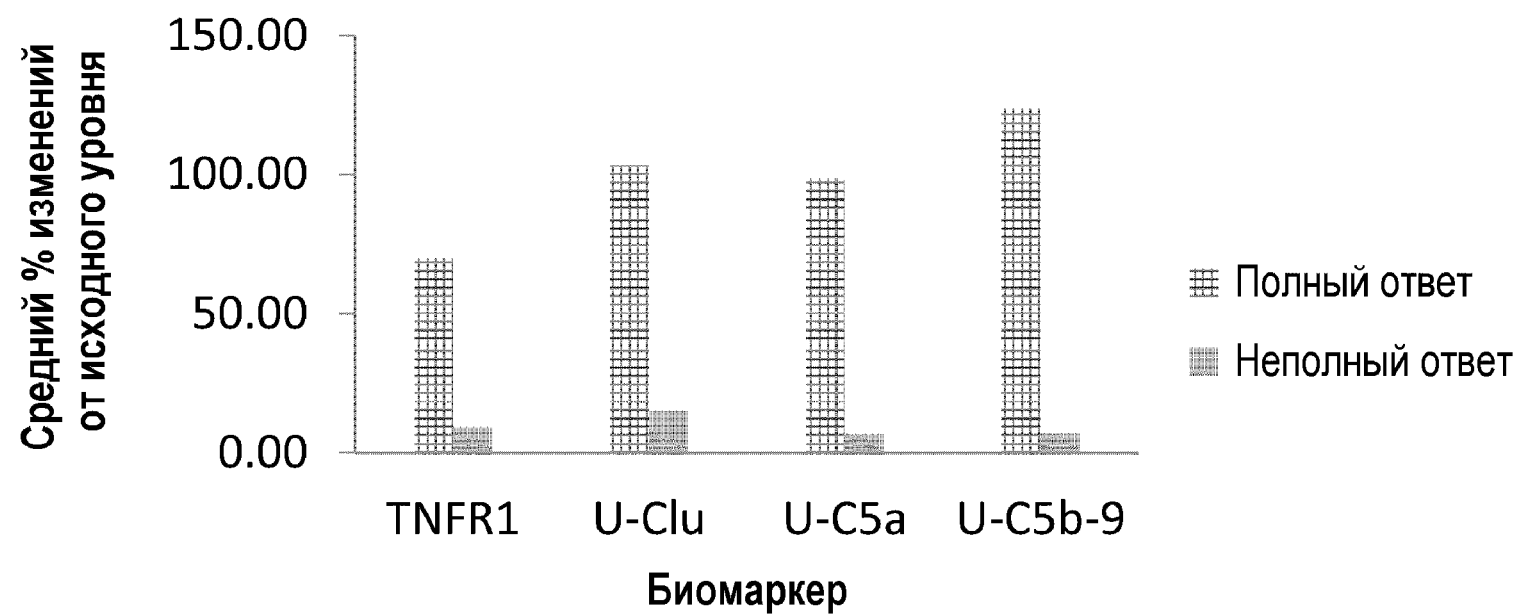
D-димер



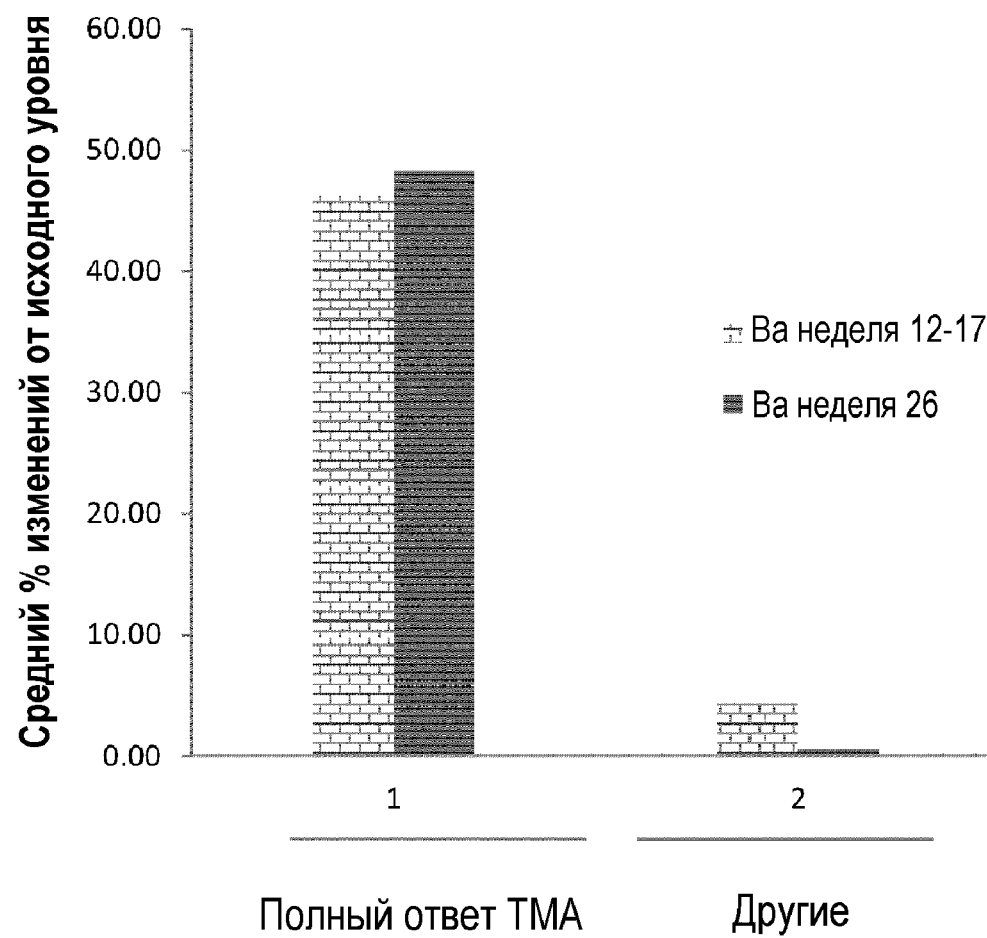
ФИГ.10I

F 1+2

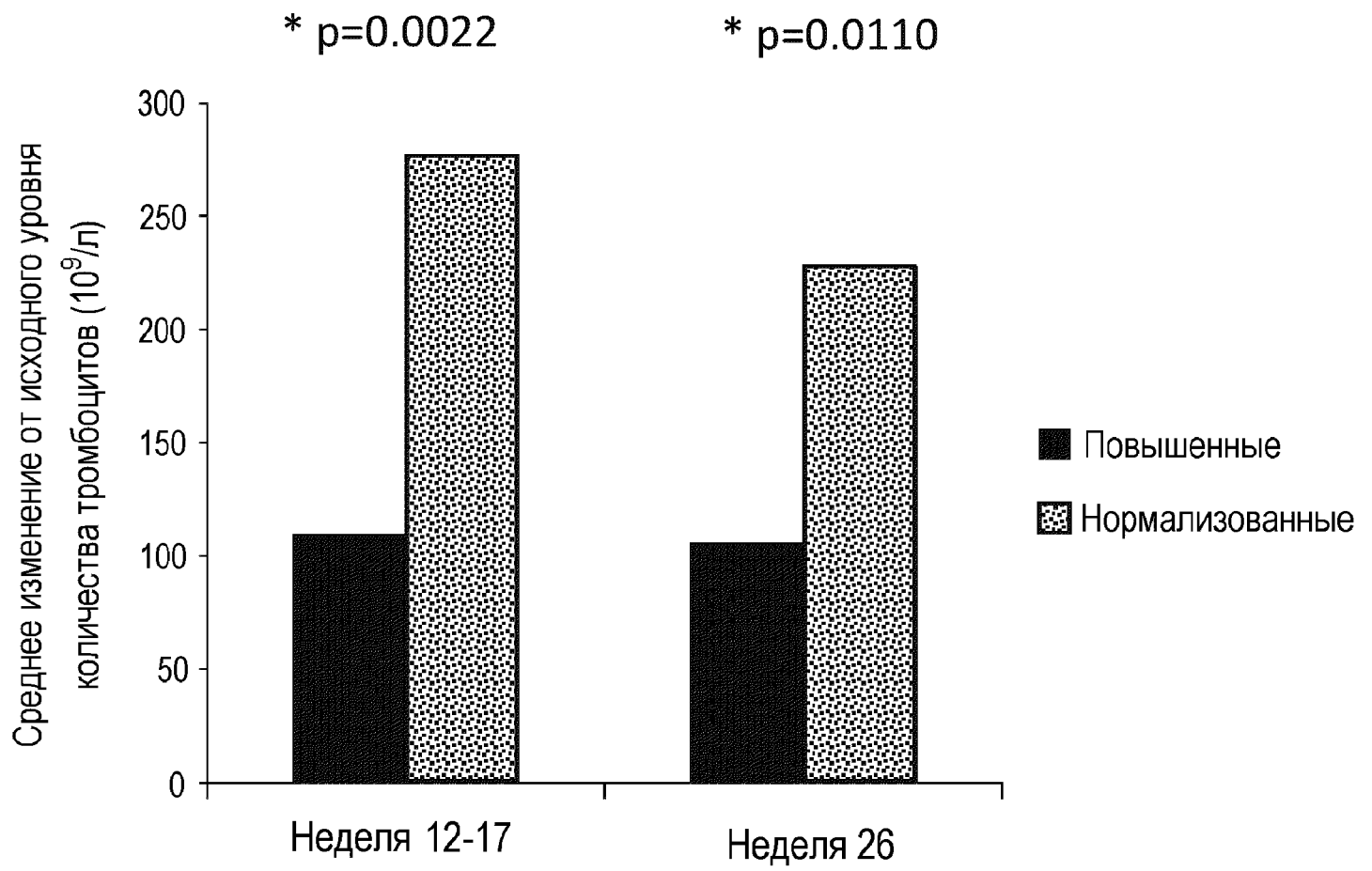




ФИГ.11



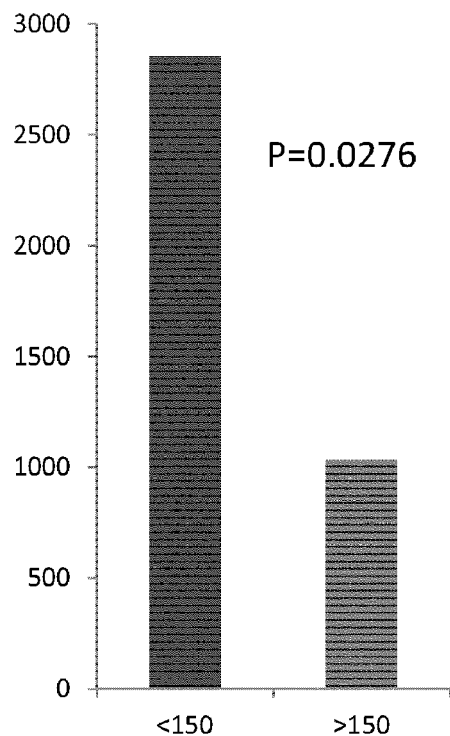
ФИГ.12



ФИГ.13

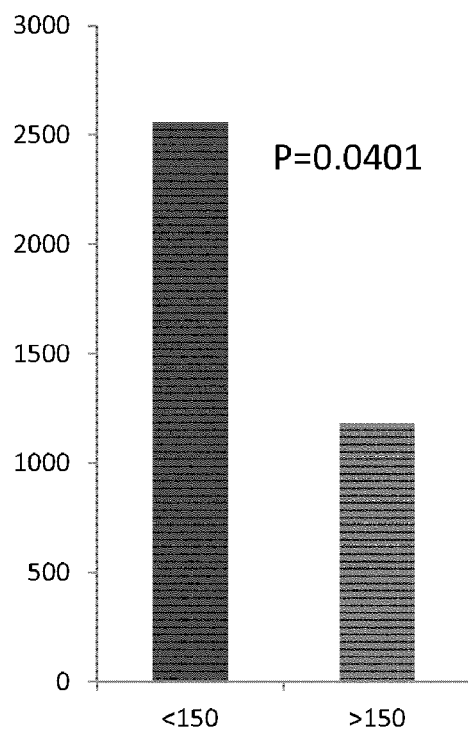
ТРОМБОЦИТЫ

U Cys-C



ФИГ.14А

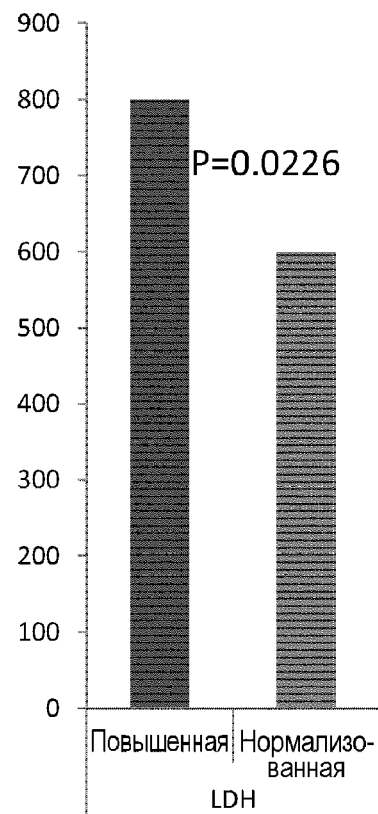
U-кластерин



ФИГ.14В

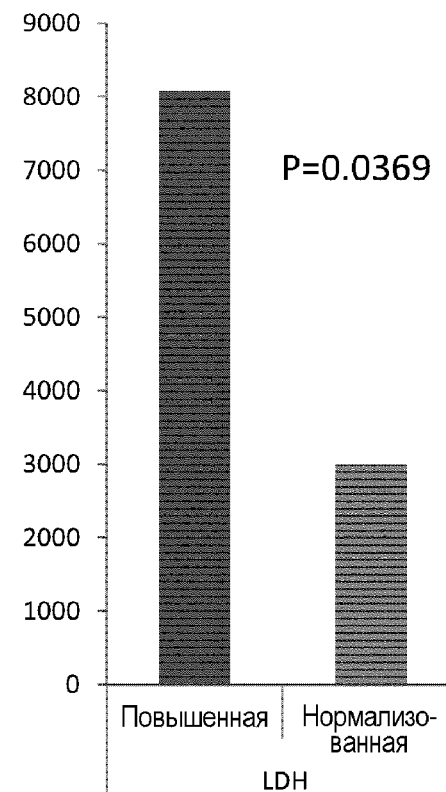
LDH

VCAM-1



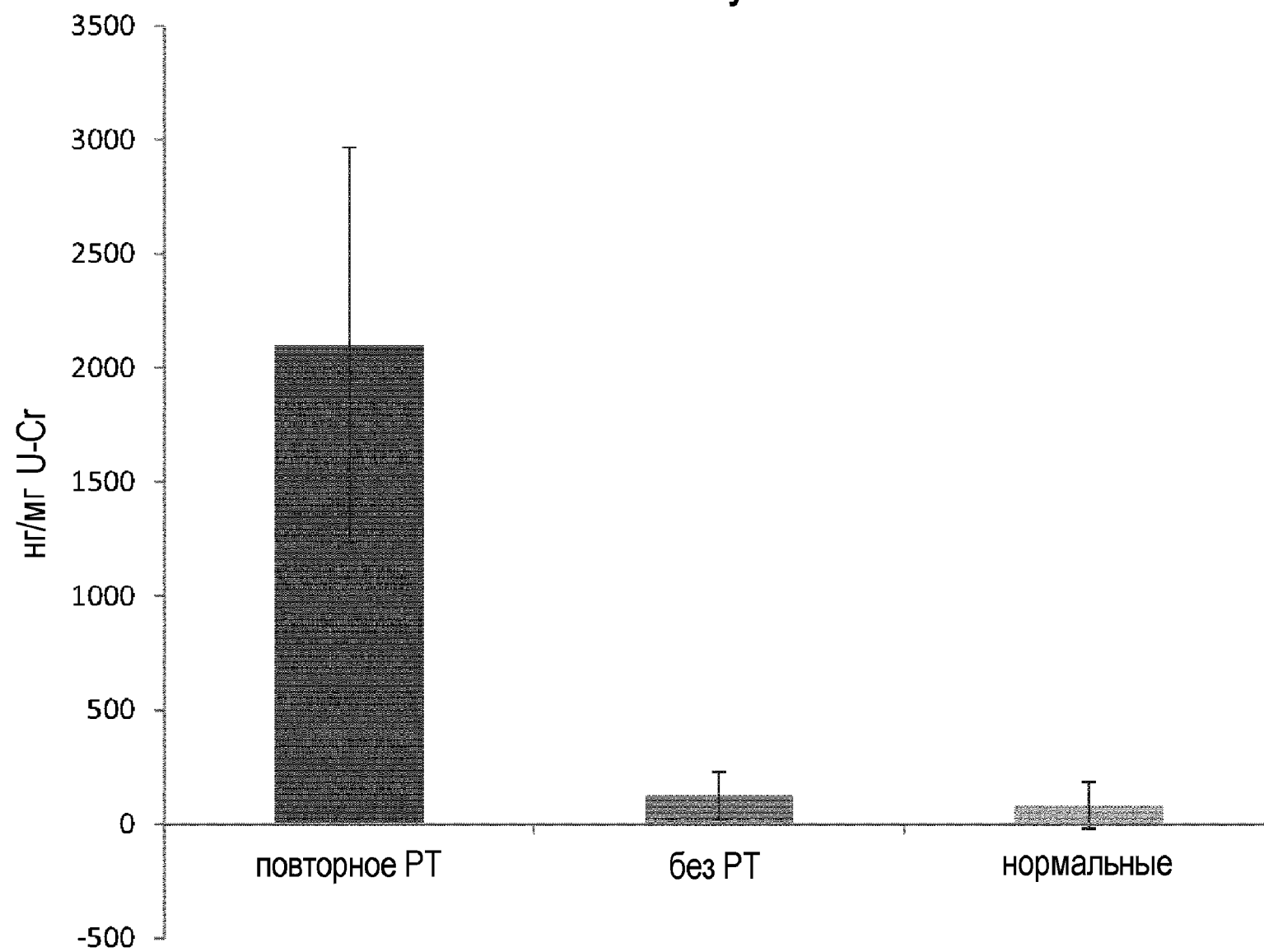
ФИГ.14С

D-димер

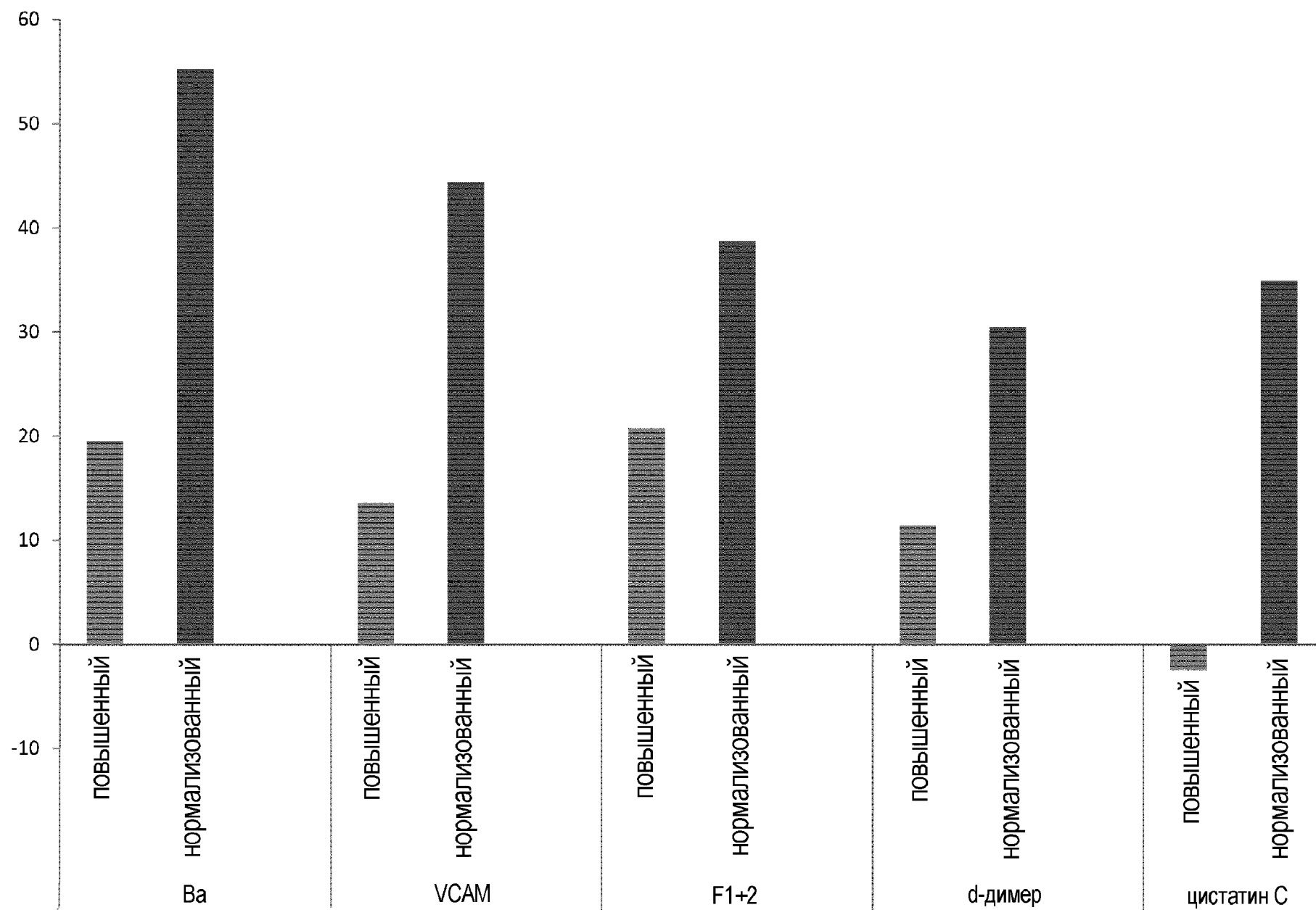


ФИГ.14D

Сус С мочи

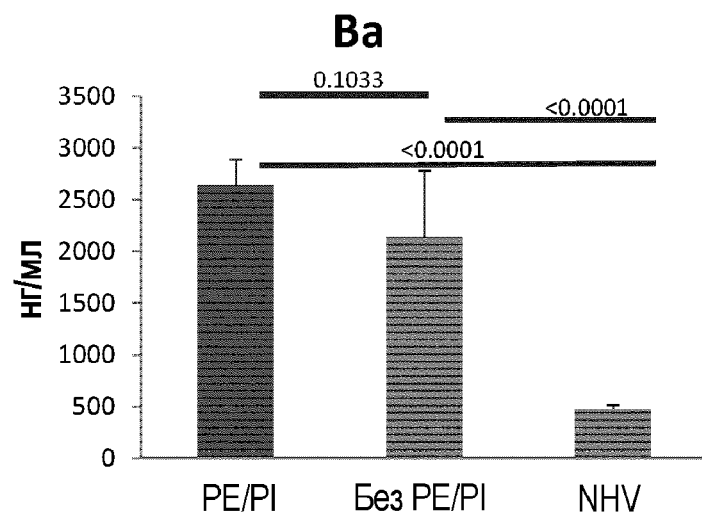


ФИГ.15

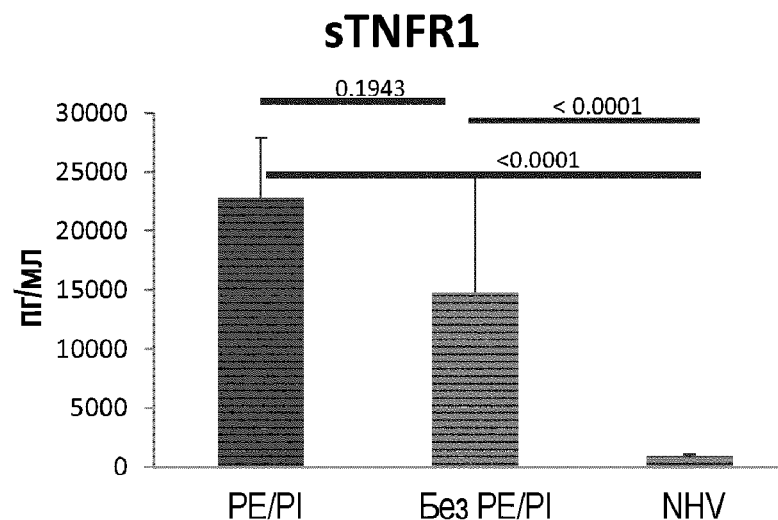
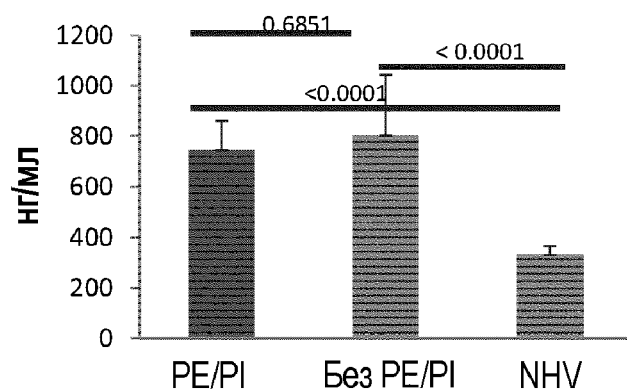
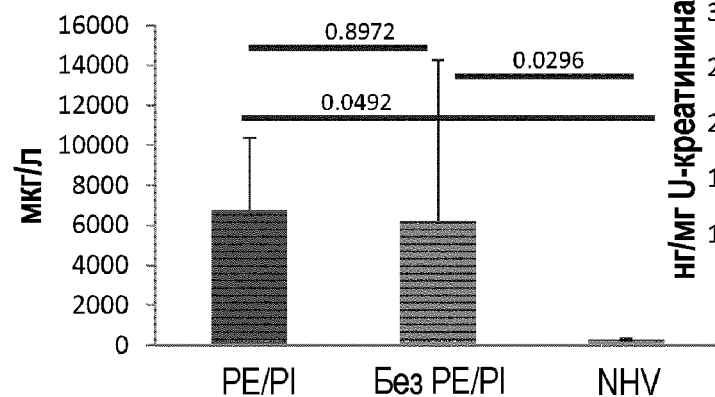
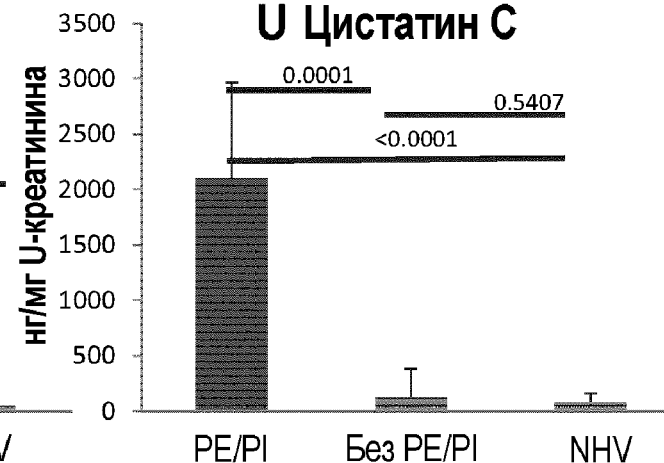


ФИГ.16

ФИГ.17А



ФИГ.17В

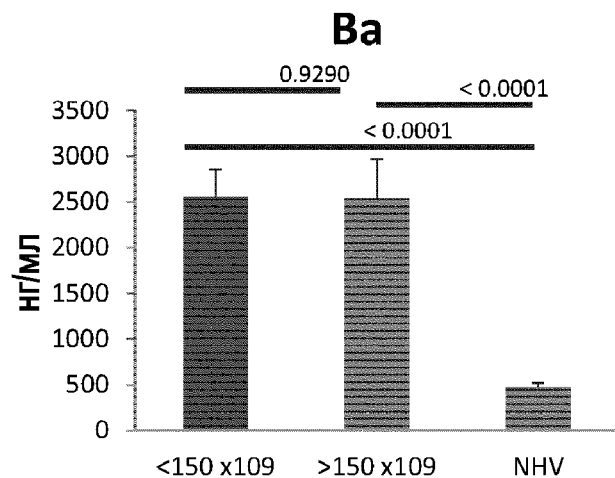
**sVCAM-1****D-димер****U Цистатин С**

ФИГ.17С

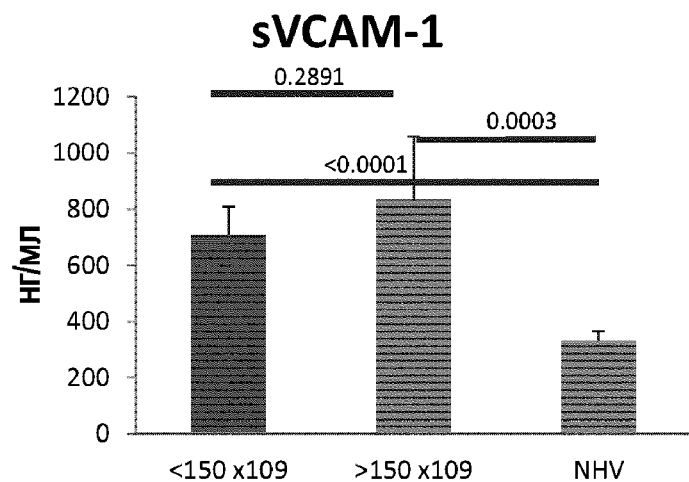
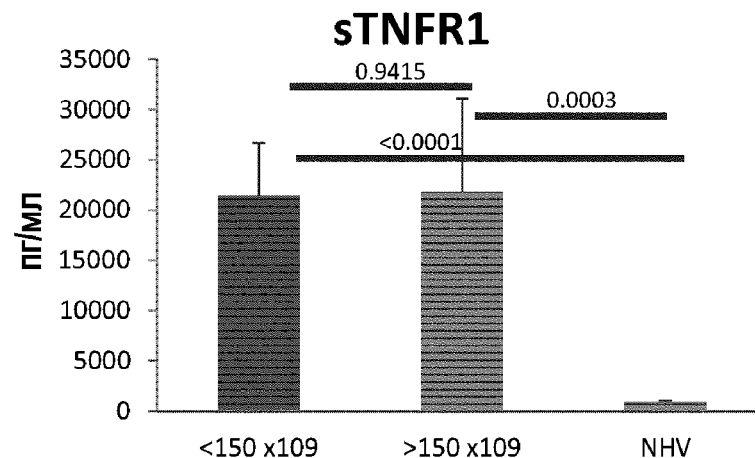
ФИГ.17D

ФИГ.17Е

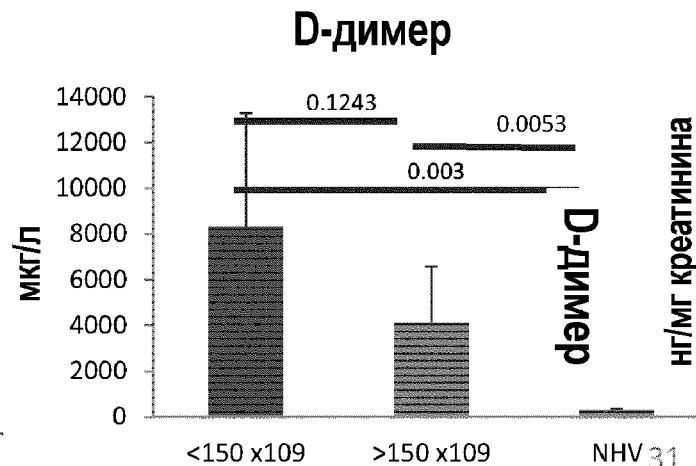
ФИГ.18А



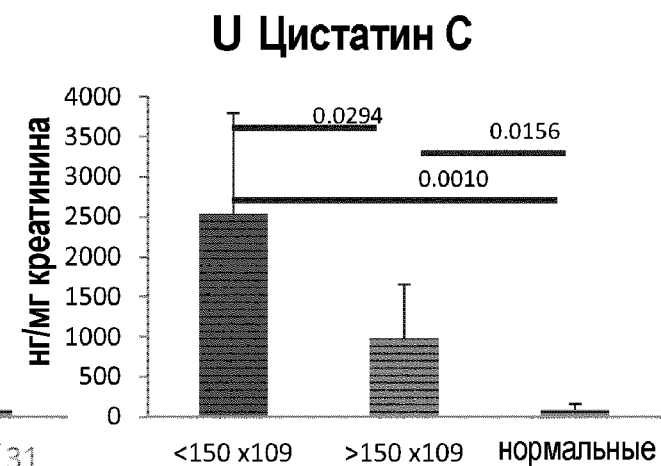
ФИГ.18В



ФИГ.18С

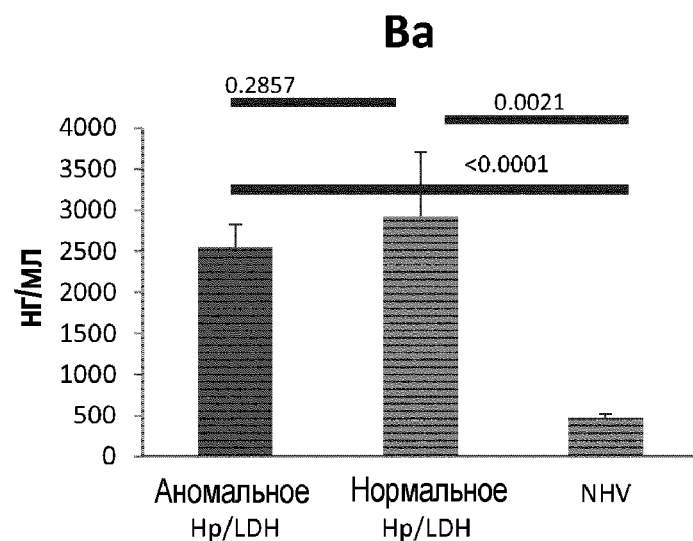


ФИГ.18D

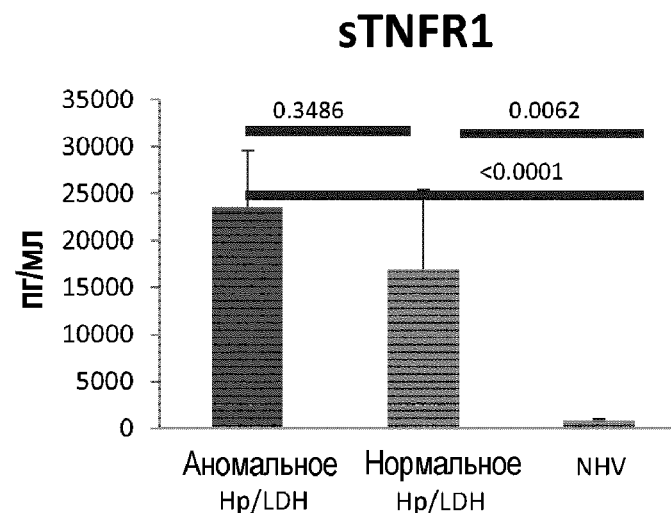


ФИГ.18Е

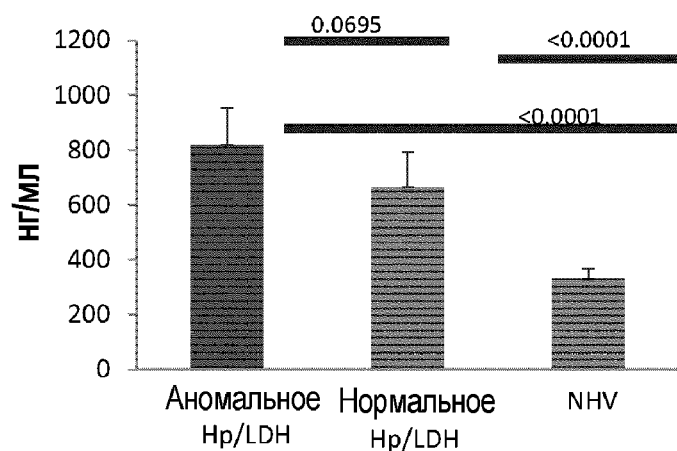
ФИГ.19А



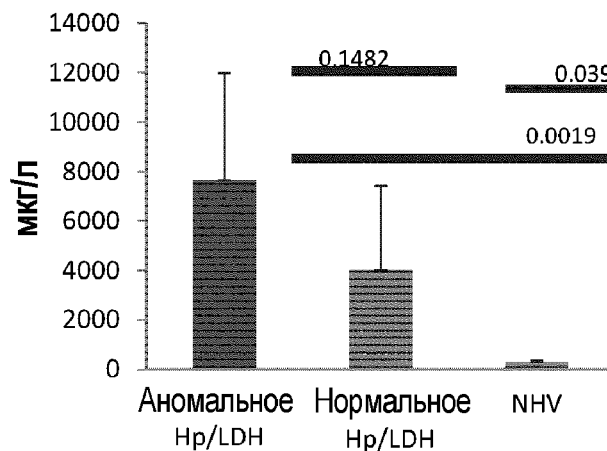
ФИГ.19В



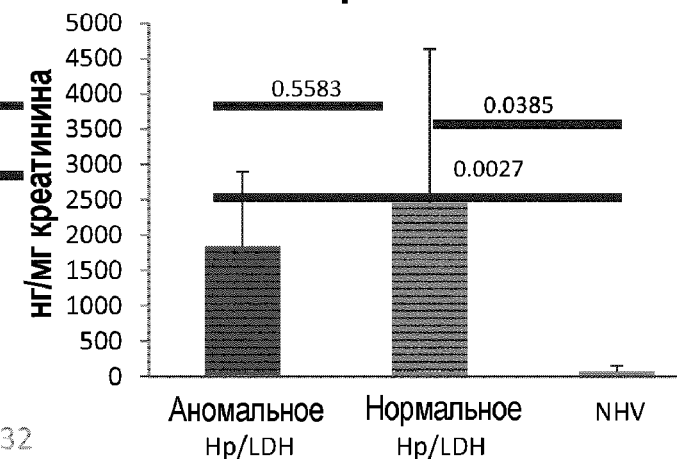
sVCAM-1



D-димер



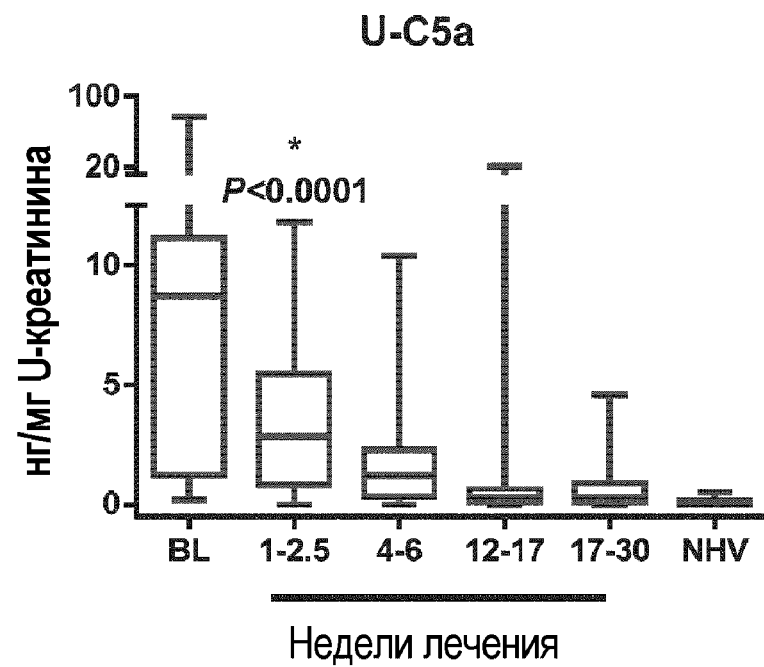
U Цистатин С



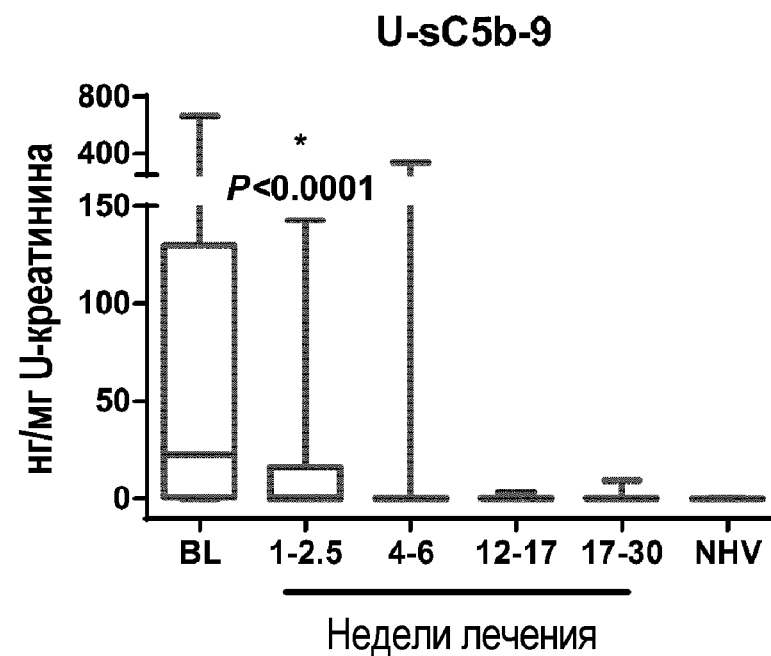
ФИГ.19С

ФИГ.19D

ФИГ.19Е

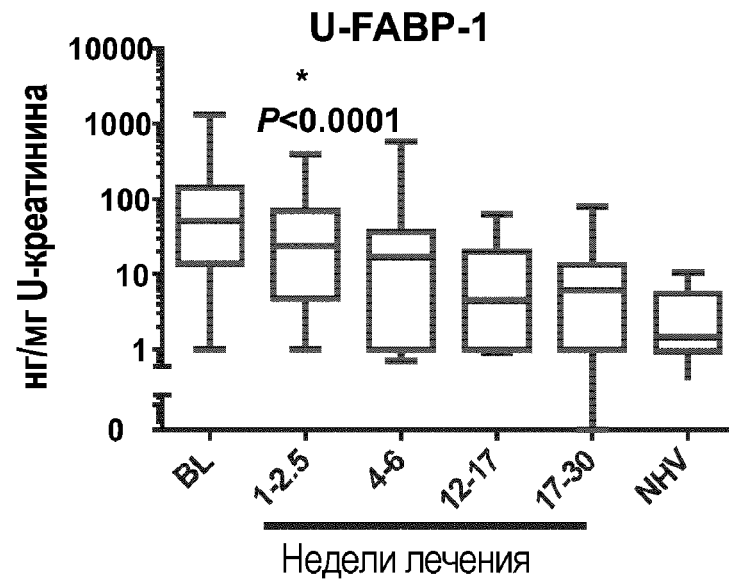


ФИГ.20А

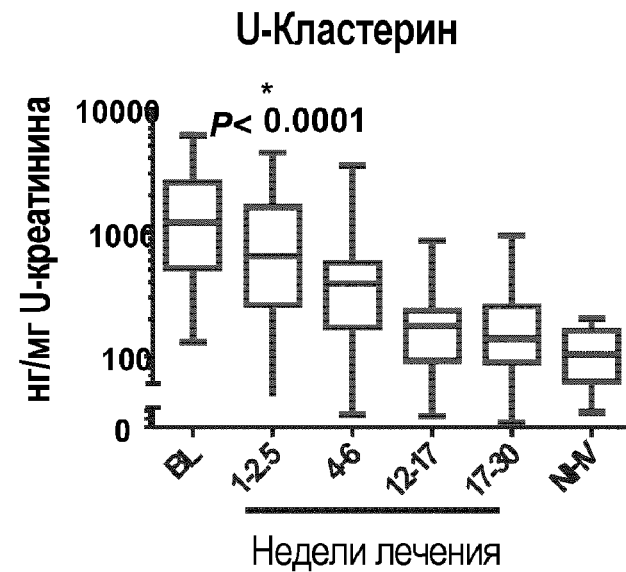
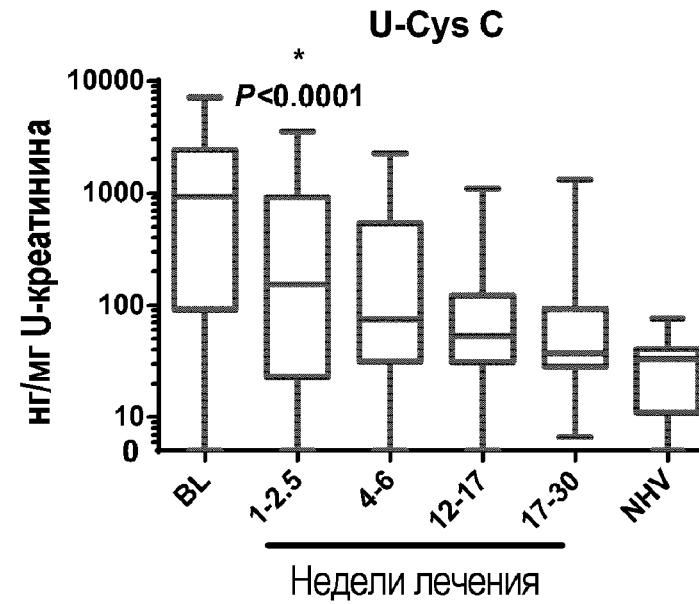


ФИГ.20В

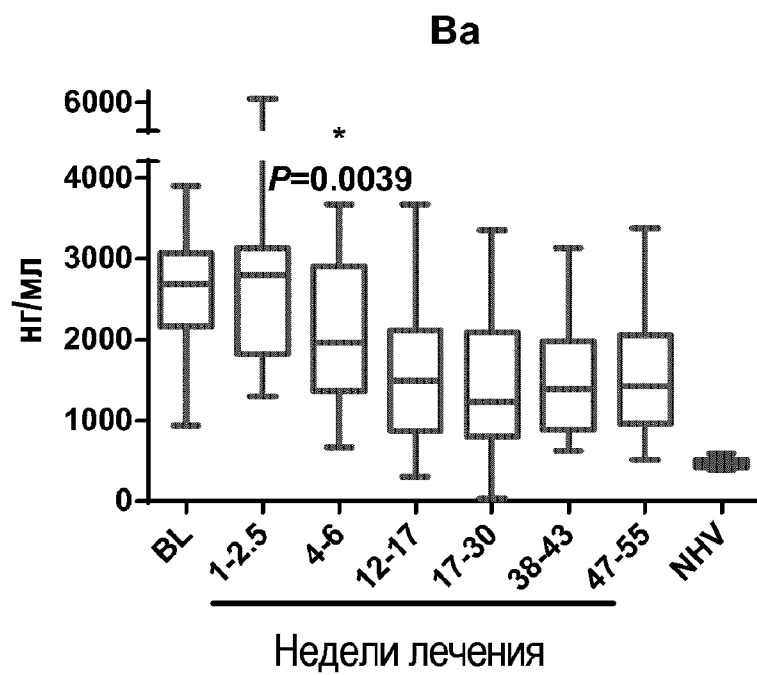
ФИГ.21А



ФИГ.21В

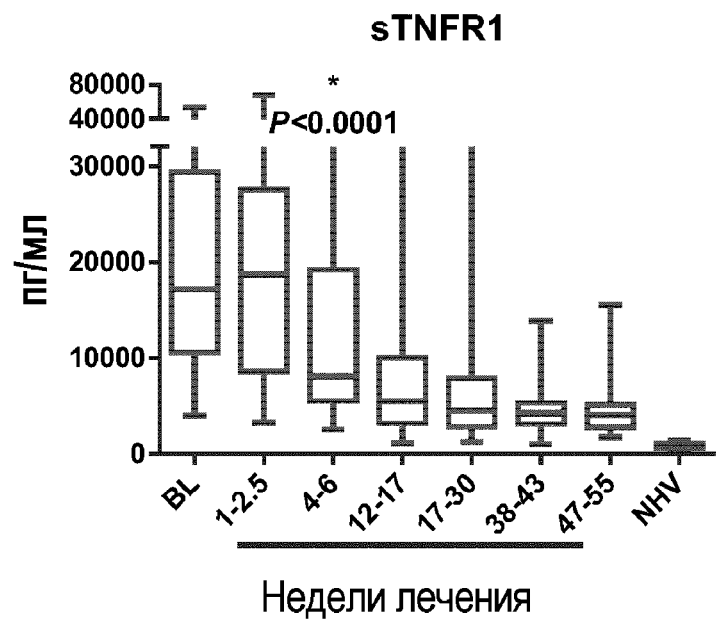


ФИГ.21С

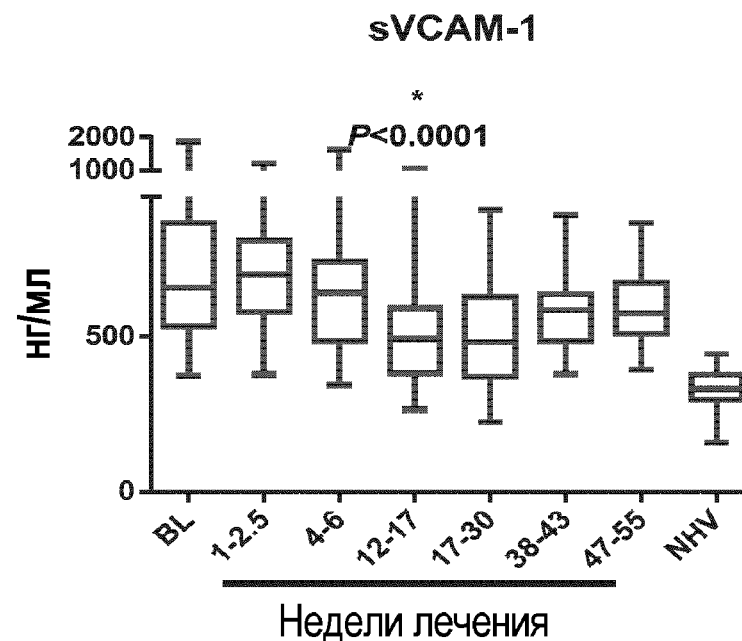


ФИГ.22

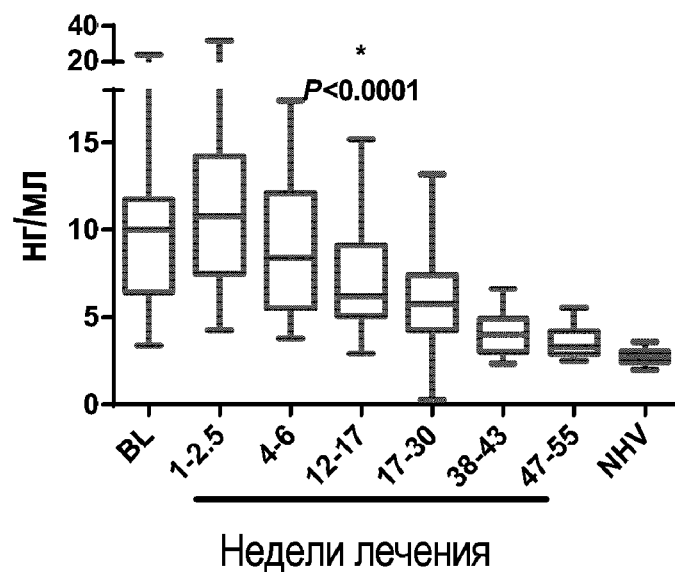
ФИГ.23А



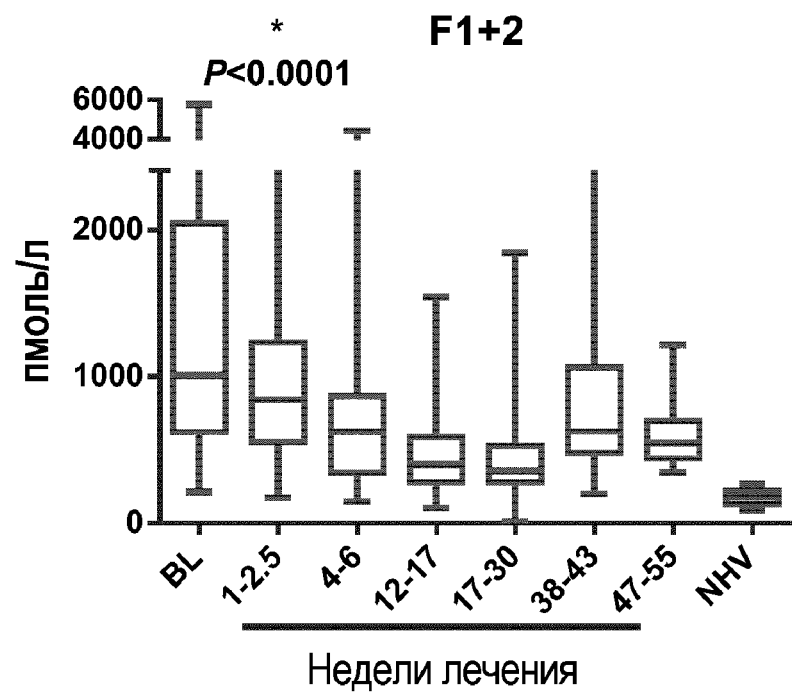
ФИГ.23В



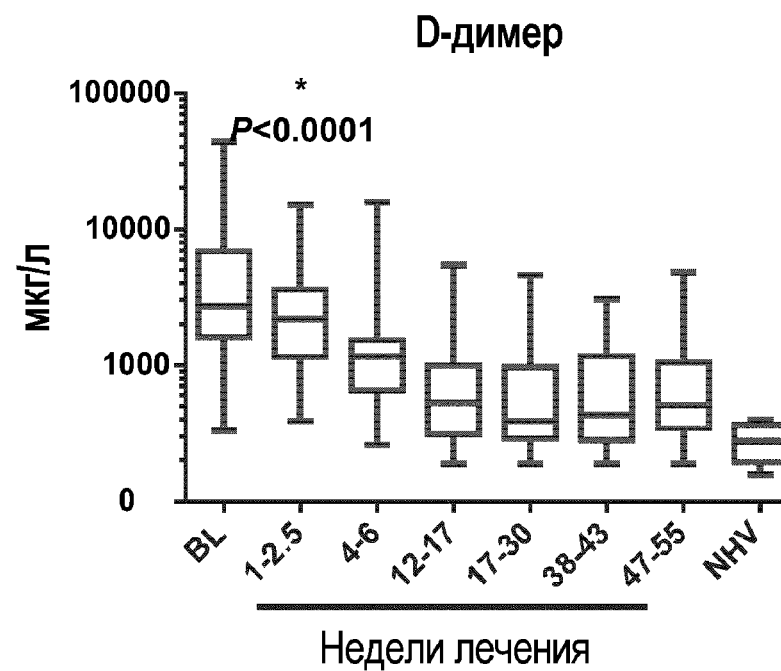
ТМ



ФИГ.23С



ФИГ.24А



ФИГ.24В

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202090129**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:****G01N 33/68** (2006.01)**A61P 13/12** (2006.01)**A61P 43/00** (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

G01N33/68, A61P13/00, 13/12, 43/00Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
EAPATIS, PubMed**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WEITZ M. et al., "Prophylactic Eculizumab Prior to Kidney Transplantation for Atypical Hemolytic Uremic Syndrome", <i>Pediatr Nephrol.</i> 2011 Aug;26(8):1325-9. doi: 10.1007/s00467-011-1879-9. Epub 2011 May 10, реферат.	1, 2, 6
A	NESTER C.M. et al., "Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: What Is It, How Is It Diagnosed, and How Is It Treated?", <i>Hematology Am Soc Hematol Educ Program.</i> 2012;2012:617-25. doi: 10.1182/asheducation-2012.1.617, реферат.	1, 2, 6
A	ZUBER J. et al., "Use of Eculizumab for Atypical Haemolytic Uraemic Syndrome and C3 Glomerulopathies", <i>Nat Rev Nephrol.</i> 2012 Nov;8(11):643-57. doi: 10.1038/nrneph.2012.214. Epub 2012 Oct 2, реферат.	1, 2, 6
A	MEHLA R. et al., "Programming of Neurotoxic Cofactor CXCL-10 in HIV-1-associated Dementia: Abrogation of CXCL-10-induced Neuro-Glial Toxicity in Vitro by PKC Activator", <i>J Neuroinflammation.</i> 2012 Oct 18;9:239. doi: 10.1186/1742-2094-9-239, реферат.	1, 2, 6

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **29/06/2020**

Уполномоченное лицо:

Заместитель начальника Управления экспертизы

Начальник отдела химии и медицины

А.В.Чебан

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202090129

Раздел I. ЗАМЕЧАНИЯ ДЛЯ СЛУЧАЯ, КОГДА НЕКОТОРЫЕ ПУНКТЫ ФОРМУЛЫ ИЗОБРЕТЕНИЯ НЕ ПОДЛЕЖАТ ПОИСКУ

Настоящий отчет о патентном поиске не охватывает некоторые пункты формулы изобретения по следующим причинам:

1. ☐ пункты формулы изобретения №:
т.к. они относятся к объектам, указанным в правиле 3(3) Патентной инструкции к ЕАПК, а именно:

2. ☐ пункты формулы изобретения №:
т.к. они относятся к части евразийской заявки, которая не отвечает установленным требованиям в такой степени, что по ней невозможно провести полноценный патентный поиск, а именно:

Раздел II. ЗАМЕЧАНИЯ ДЛЯ СЛУЧАЯ НЕСОБЛЮДЕНИЯ ЕДИНСТВА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Единство изобретения не соблюдено по следующим причинам:

Заявленные в формуле изобретения не объединены общим техническим признаком, который обуславливает вклад, вносимый в уровень техники каждым изобретением, что не соответствует Правилу 4 Патентной инструкции к Евразийской патентной конвенции

Таким образом, изобретения могут быть сгруппированы следующим образом:

- 1) техническое решение по пп.1, 2 и 6 (частично), которое относится к способу лечения атипичного гемолитического уремического синдрома (аHUS) у индивидуума-человека. Особым техническим признаком данной группы является использование в качестве биомаркера аHUS концентрации VCAM-1;
- 2) техническое решение по пп.3 и 6 (частично), которое относится к способу лечения атипичного гемолитического уремического синдрома (аHUS) у индивидуума-человека. Особым техническим признаком данной группы является использование в качестве биомаркеров аHUS по меньшей мере двух биомаркеров, выбранных из sTNFR1, протеолитического фрагмента фактора В компонента комплемента, sC5b9, фрагмента F1+2 протромбина, d-димера, тромбомодулина, компонента C5a комплемента, β 2М, кластерина, цистатина С, белка 1, FABP-1, sCD40L, VEGF, лиганда земокина 9 (мотив С-Х-С), лиганда хемокина 10 (мотив С-Х-С), белка-1 хемотаксиса моноцитов, молекулы-1 адгезии клеток сосудов и тканевого ингибитора металлопротеазы-1; и
- 3) техническое решение по пп.4, 5 и 6 (частично), которое относится к способу лечения атипичного гемолитического уремического синдрома (аHUS) у индивидуума-человека. Особым техническим признаком данной группы является использование в качестве биомаркера аHUS концентрации FABP-1, цистатина С и/или кластерина.