(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202090504 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.28

(22) Дата подачи заявки
2018.08.14

(51) Int. Cl. ***A61K 38/00*** (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C12N 9/50 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ И/ИЛИ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ РЕАКЦИИ ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА, И/ИЛИ ДИФФУЗНОГО АЛЬВЕОЛЯРНОГО КРОВОТЕЧЕНИЯ, И/ИЛИ ВЕНООККЛЮЗИОННОЙ БОЛЕЗНИ, СВЯЗАННЫХ С ТРАНСПЛАНТАТОМ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

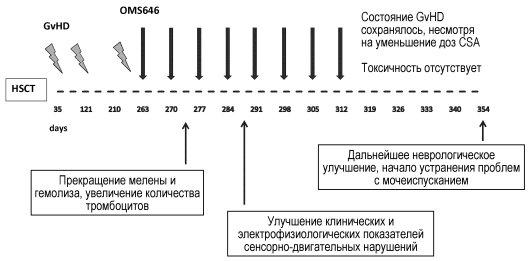
(31) **62/545,864; 62/574,690; 62/630,756; 62/637,281**
(32) **2017.08.15; 2017.10.19; 2018.02.14; 2018.03.01**
(33) **US**
(86) **PCT/US2018/046690**
(87) **WO 2019/036460 2019.02.21**

(71) Заявитель:
ОМЕРОС КОРПОРЕЙШН (US); ЮНИВЕРСИТИ ОФ ЛЕСТЕР (GB)

(72) Изобретатель:
Демопулос Грегори А., Дадлер Томас (US), Швебле Ханс-Вильхельм (GB)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В одном аспекте изобретение относится к способам ингибирования эффектов MASP-2-зависимой активации комплемента у субъекта-человека, страдающего от реакции трансплантат против хозяина, и/или диффузного альвеолярного кровотечения, и/или веноокклюзионной болезни, связанных с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток. Способы включают этап введения субъекту, который нуждается в этом, ингибирующего MASP-2 средства в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента.



202090504 A1

202090504 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-561159EA/019

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ И/ИЛИ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ РЕАКЦИИ ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА И/ИЛИ ДИФФУЗНОГО АЛЬВЕОЛЯРНОГО КРОВОТЕЧЕНИЯ, И/ИЛИ ВЕНООККЛЮЗИОННОЙ БОЛЕЗНИ, СВЯЗАННЫХ С ТРАНСПЛАНТАТОМ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

ЗАЯВЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Список последовательностей, относящийся к настоящей заявке, предоставлен в текстовом формате вместо бумажной копии и включен в настоящее описание посредством ссылки. Текстовый файл, содержащий список последовательностей, имеет название MP_1_0278_PCT_SequenceListingasFiled_20180807; txt файл имеет размер 116 KB; он был создан 7 августа 2018 г., и был подан через EFS-Web при подаче заявки.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Система комплемента обеспечивает механизм раннего действия для инициации, усиления и организации иммунного ответа на микробную инфекцию и другие острые повреждающие факторы (M.K. Liszewski and J.P. Atkinson, 1993, в: Fundamental Immunology, Third Edition, под редакцией W.E. Paul, Raven Press, Ltd., New York) у человека и других позвоночных. При том, что активация комплемента обеспечивает ценную защиту первой линии от потенциальных патогенов, активность комплемента, которая способствуют защитному иммунному ответу, также может представлять потенциальную угрозу для хозяина. (K.R. Kalli, et al., Springer Semin. Immunopathol. 15:417-431, 1994; B.P. Morgan, Eur. J. Clinical Investig. 24:219-228, 1994). Например, протеолитические продукты C3 и C5 привлекают и активируют нейтрофилы. Будучи незаменимыми для защиты хозяина, активированные нейтрофилы являются неизбирательными в высвобождении разрушительных ферментов и могут вызывать повреждение органов. Кроме того, активация комплемента может вызывать отложение литических компонентов комплемента на соседних клетках-хозяевах, как и на микробных мишенях, что приводит к лизису клеток-хозяев. Система комплемента также вовлечена в патогенез многочисленных острых и хронических заболеваний, включая: инфаркт миокарда, инсульт, ARDS, реперфузионное повреждение, септический шок, повышенную проницаемость капилляров после термических ожогов, воспаление после применения аппарата искусственного кровообращения, отторжение трансплантата, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, миастению и болезнь Альцгеймера. Почти при всех этих состояниях комплемент не является причиной, а является одним из нескольких факторов, вовлеченных в патогенез. Тем не менее, активация комплемента может быть основным патологическим механизмом и представляет собой эффективное звено для клинического контроля во многих из этих болезненных состояний. Растущее признание важности опосредованного комплементом повреждения тканей при различных болезненных состояниях подчеркивает необходимость в эффективных ингибирующих комплемент

лекарственных средствах. В настоящее время экулизумаб (солирис®), антитело против C5, является единственным направленным на комплемент лекарственным средством, которое было одобрено для лечения людей. Тем не менее, C5 является одной из нескольких эффекторных молекул, расположенных «ниже по течению» в системе комплемента, и блокада C5 не препятствует активации системы комплемента. Вследствие этого, ингибитор этапов инициации активации комплемента будет иметь значительные преимущества в сравнении с ингибитором действующих на более поздних этапах компонентов комплемента.

В настоящее время широко распространено мнение, что система комплемента может быть активирована тремя различными путями: классическим путем, лектиновым путем и альтернативным путем. Классический путь, как правило, запускается комплексом, состоящим из антител хозяина, связанных с инородной частицей (то есть, антигеном), и, таким образом, для него необходимо предварительное воздействие антигена для индукции ответа в виде выработки специфических антител. Поскольку активация классического пути зависит от предшествующего адаптивного иммунного ответа хозяина, классический путь является частью приобретенной иммунной системы. Напротив, как лектиновый, так и альтернативный, пути не зависят от адаптивного иммунитета и являются частью врожденной иммунной системы.

Активация системы комплемента приводит к последовательной активации зимогенов сериновых протеаз. Первым этапом активации классического пути является связывание специфической молекулы узнавания, C1q, с молекулами IgG и IgM, связанными с антигеном. Компонент C1q связан с проферментами сериновых протеаз C1r и C1s в комплекс, называемый C1. После связывания C1q с иммунным комплексом происходит аутопротеолитическое расщепление сайта Arg-Ile в C1r, с последующим опосредованным C1r расщеплением и активацией C1s, который вследствие этого приобретает способность расщеплять C4 и C2. C4 расщепляется на два фрагмента, обозначенные C4a и C4b, и, аналогично, C2 расщепляется на C2a и C2b. Фрагменты C4b способны образовывать ковалентные связи с соседними гидроксильными или аминогруппами и создавать C3-конвертазу (C4b2a) за счет нековалентного взаимодействия с фрагментом C2a активированного C2. C3-конвертаза (C4b2a) активирует C3 путем его протеолитического расщепления на подкомпоненты C3a и C3b, что приводит к образованию C5-конвертазы (C4b2a3b), которая путем расщепления C5 приводит к образованию мембраноатакующего комплекса (C5b в сочетании с C6, C7, C8 и C-9, также называемого «MAC»), который может разрушать клеточные мембраны, приводя к лизису клеток. Активированные формы C3 и C4 (C3b и C4b) образуют ковалентные отложения на поверхностях инородных мишеней, узнаваемые рецепторами комплемента на множестве фагоцитов.

Независимо, первый этап в активации системы комплемента через лектиновый путь также представляет собой связывание специфических молекул узнавания, с последующей активацией связанных проферментов сериновых протеаз. Однако вместо

связывающего иммунные комплексы C1q молекулы узнавания в лектиновом пути включают группу углевод-связывающих белков (маннан-связывающий лектин (MBL), H-фиколин, M-фиколин, L-фиколин и лектин C-типа CL-11), имеющих общее название «лектины». Смотри J. Lu et al., Biochim. Biophys. Acta 1572:387-400, (2002); Holmskov et al., Annu. Rev. Immunol. 21:547-578 (2003); Teh et al., Immunology 101:225-232 (2000)). Смотри также J. Luet et al., Biochim Biophys Acta 1572:387-400 (2002); Holmskov et al., Annu Rev Immunol 21:547-578 (2003); Teh et al., Immunology 101:225-232 (2000); Hansen et al., J. Immunol 185(10):6096-6104 (2010).

Ikeda с соавторами впервые продемонстрировали, что подобно C1q, MBL может активировать систему комплемента после связывания с покрытыми дрожжевым маннаном эритроцитами независимым от C4 образом (Ikeda et al., J. Biol. Chem. 262:7451-7454, (1987)). MBL, представитель семейства белков коллектинов, представляет собой кальций-зависимый лектин, который связывает углеводы с 3- и 4-гидроксильными группами, ориентированными в экваториальной плоскости пиранозного кольца. Таким образом, главными лигандами для MBL являются D-манноза и N-ацетил-D-глюкозамин, в то время как углеводы, не соответствующие этому стерическому требованию, имеют не поддающуюся обнаружению аффинность для MBL (Weis et al., Nature 360:127-134, (1992)). Взаимодействие между MBL и одновалентными сахарами является чрезвычайно слабым, с константами диссоциации, как правило, в миллимолярном диапазоне с однозначными значениями. MBL достигает прочного специфического связывания с гликановыми лигандами за счет авидности, то есть, за счет одновременного взаимодействия со множеством моносахаридных остатков, расположенных в непосредственной близости друг от друга (Lee et al., Archiv. Biochem. Biophys. 299:129-136, (1992)). MBL узнает углеводные паттерны, которые обычно имеются на поверхности таких микроорганизмов, как бактерии, дрожжи, паразиты и некоторые вирусы. Напротив, MBL не узнает D-галактозу и сиаловую кислоту, предпоследний и последний сахара, которые обычно присутствуют на «зрелых» сложных гликоконъюгатах, находящихся на гликопротеинах плазмы и клеточной поверхности у млекопитающих. Считают, что эта специфичность связывания стимулирует узнавание «чужеродных» поверхностей и помогает защищать от «самоактивации». Однако MBL связывает с высокой аффинностью кластеры «предшественников» гликанов с высоким содержанием маннозы на N-связанных гликопротеинах и гликолипидах, секвестрированных в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи в клетках млекопитающих (Maynard et al., J. Biol. Chem. 257:3788-3794, (1982)). Вследствие этого, поврежденные клетки являются потенциальными мишенями для активации лектинового пути за счет связывания MBL.

Фиколины имеют иной тип домена лектина, чем MBL, называемый фибриноген-подобным доменом. Фиколины связывают сахарные остатки независимым от Ca^{++} образом. У человека идентифицированы фиколины трех видов (L-фиколин, M-фиколин и H-фиколин). Два сывороточных фиколина, L-фиколин и H-фиколин, имеют общую специфичность в отношении N-ацетил-D-глюкозамина; однако H-фиколин также

связывает N-ацетил-D-галактозамин. Разница в специфичности L-фиколина, H-фиколина, CL-11 и MBL в отношении сахаров означает, что разные лектины могут быть комплементарными и иметь мишенью разные, хотя и перекрывающиеся, гликоконъюгаты. В пользу данной концепции свидетельствует недавнее сообщение о том, что из известных лектинов в лектиновом пути лишь L-фиколин связывает специфически липотейхоевую кислоту, гликоконъюгат клеточной стенки, обнаруженный на всех грамположительных бактериях (Lynch et al., J. Immunol. 172:1198-1202, (2004)). Коллектины (то есть, MBL) и фиколины не имеют значительного сходства аминокислотных последовательностей. Однако две группы белков имеют сходную организацию доменов и, подобно C1q, собираются в олигомерные структуры, которые максимально увеличивают возможность связывания во множестве сайтов.

Сывороточные концентрации MBL являются высоко вариабельными в популяциях здоровых субъектов, и это генетически контролируется за счет полиморфизмов/мутаций как в промоторе, так и в кодирующих областях гена MBL. Экспрессия MBL, как белка острой фазы, дополнительно стимулируется при воспалении. L-фиколин присутствует в сыворотке в концентрациях, аналогичных концентрациям MBL. Таким образом, L-фиколиновая ветвь лектинового пути потенциально сопоставима с ветвью MBL по силе. MBL и фиколины также могут действовать в качестве опсонинов, что позволяет фагоцитам нацеливаться на содержащие MBL и фиколин поверхности (смотри Jack et al., J Leukoc Biol., 77(3):328-36 (2004), Matsushita and Fujita, Immunobiology, 205(4-5):490-7 (2002), Aoyagi et al., J Immunol, 174(1):418-25(2005). Для такой опсонизации необходимо взаимодействие этих белков с рецепторами фагоцитов (Kuhlman et al., J. Exp. Med. 169:1733, (1989); Matsushita et al., J. Biol. Chem. 271:2448-54, (1996)), которые не идентифицированы.

Человеческий MBL вступает в специфическое и высокоаффинное взаимодействие через его коллаген-подобный домен с уникальными C1r/C1s-подобными сериновыми протеазами, называемыми «MBL-ассоциированные сериновые протеазы (MASP)». До настоящего времени описаны три MASP. Во-первых, один фермент «MASP» был идентифицирован и охарактеризован как фермент, ответственный за инициацию каскада комплемента (то есть, расщепления C2 и C4) (Matsushita et al., J Exp Med 176(6):1497-1502 (1992); Ji et al., J. Immunol. 150:571-578, (1993)). Впоследствии было определено, что активность MASP фактически представляла собой активность смеси двух протеаз: MASP-1 и MASP-2 (Thiel et al., Nature 386:506-510, (1997)). Однако было продемонстрировано, что одного комплекса MBL-MASP-2 достаточно для активации комплемента (Vorup-Jensen et al., J. Immunol. 165:2093-2100, (2000)). Более того, только MASP-2 расщеплял C2 и C4 с высокой скоростью (Ambrus et al., J. Immunol. 170:1374-1382, (2003)). Таким образом, MASP-2 представляет собой протеазу, ответственную за активацию C4 и C2, с образованием C3-конвертазы, C4b2a. Это является существенным отличием от комплекса C1 классического пути, где координированное действие двух специфических сериновых протеаз (C1r и C1s) приводит к активации системы комплемента. Кроме того, была

выделена третья новая протеаза, MASP-3, (Dahl, M.R., et al., Immunity 15:127-35, 2001). MASP-1 и MASP-3 представляют собой продукты альтернативного сплайсинга одного и того же гена.

MASP имеют организацию доменов, идентичную таковой в C1r и C1s, ферментативных компонентах комплекса C1 (Sim et al., Biochem. Soc. Trans. 28:545, (2000)). Эти домены включают N-концевой домен C1r/C1s/VEGF морского ежа/костного морфогенетического белка (CUB), подобный эпидермальному фактору роста домен, второй домен CUB, тандем доменов контрольного белка комплемента и домен сериновой протеазы. Как и в протеазах C1, активация MASP-2 происходит в результате расщепления связи Arg-Ile вблизи домена сериновой протеазы, что приводит к разделению фермента на связанные дисульфидной связью цепи A и B, последняя из которых состоит из домена сериновой протеазы.

MBL также может связываться с альтернативно сплайсированной формой MASP-2, известной как MBL-ассоциированный белок размером 19 кДа (MAp19), или малый MBL-ассоциированный белок (sMAP), который лишен каталитической активности MASP2. (Stover, J. Immunol. 162:3481-90, (1999); Takahashi et al., Int. Immunol. 11:859-863, (1999)). MAp19 содержит первые два домена MASP-2, за которыми следует дополнительная последовательность из четырех уникальных аминокислот. Функция Map19 неясна (Degn et al., J Immunol. Methods, 2011). Гены MASP-1 и MASP-2 расположены на хромосомах 3 и 1 человека, соответственно (Schwaeble et al., Immunobiology 205:455-466, (2002)).

Некоторые данные позволяют предположить, что существуют разные комплексы MBL-MASP, и большая фракция MASP в сыворотке не находится в комплексе с MBL (Thiel, et al., J. Immunol. 165:878-887, (2000)). Как H-, так и L-фиколин, связывают все MASP и активируют лектиновый путь комплемента, аналогично MBL (Dahl et al., Immunity 15:127-35, (2001); Matsushita et al., J. Immunol. 168:3502-3506, (2002)). Как в лектиновом, так и в классическом, путях образуется C3-конвертаза (C4b2a), и на данном этапе эти два пути сходятся.

Принято считать, что лектиновый путь играет основную роль в защите хозяина от инфекции у не подвергавшегося ранее воздействию хозяина. Убедительные доказательства участия MBL в защите хозяина получены на основании анализа пациентов, имеющих сниженные сывороточные уровни функционального MBL (Kilpatrick, Biochim. Biophys. Acta 1572:401-413, (2002)). У таких пациентов наблюдается тенденция к рецидивам бактериальных и грибковых инфекций. Эти симптомы обычно проявляются в раннем возрасте, во время очевидного периода уязвимости, когда титр антител, полученных от матери, снижается, но еще не формируется полный репертуар собственных антител. Этот синдром часто является следствием мутаций в нескольких сайтах коллагеновой части MBL, которые препятствуют правильному формированию олигомеров MBL. Однако, поскольку MBL может функционировать как опсонин, независимый от комплемента, то неизвестно, до какой степени повышенная восприимчивость к инфекциям зависит от нарушенной активации комплемента.

В отличие от классического и лектинового путей, не найдено ни одного инициатора альтернативного пути для выполнения функций распознавания, которые C1q и лектины выполняют в двух других путях. В настоящее время распространено мнение, что альтернативный путь самопроизвольно подвергается низкому уровню циклической активации, которая может быть легко усилена на чужеродных или других аномальных поверхностях (бактериях, дрожжах, инфицированных вирусом клетках или поврежденной ткани), в которых отсутствуют надлежащие молекулярные элементы, удерживающие под контролем спонтанную активацию комплемента. Существуют четыре белка плазмы, непосредственно вовлеченные в активацию альтернативного пути: C3, факторы B и D, а также пропердин.

Хотя существует множество доказательств, указывающих на участие как классического, так и альтернативного, путей комплемента в патогенезе неинфекционных заболеваний человека, роль лектинового пути только начинают изучать. Недавние исследования предоставляют доказательства того, что лектиновый путь активации может быть ответственен за активацию комплемента и связанное воспаление при ишемии/реперфузионном повреждении. Collard с соавторами (2000) сообщали о том, что культивируемые эндотелиальные клетки, подвергнутые окислительному стрессу, связывают MBL, и на них происходит отложение C3 под воздействием человеческой сыворотки (Collard et al., Am. J. Pathol. 156:1549-1556, (2000)). Кроме того, обработка человеческой сывороткой с блокирующими анти-MBL моноклональными антителами ингибировала связывание MBL и активацию комплемента. Аналогичные результаты были получены в крысиной модели миокардиальной ишемии-реперфузии, в которой у крыс, которым вводили блокирующее антитело, направленное против крысиного MBL, наблюдали значительно меньшее повреждение миокарда при окклюзии коронарной артерии, чем у крыс, получавших контрольное антитело (Jordan et al., Circulation 104:1413-1418, (2001)). Молекулярный механизм связывания MBL с эндотелием сосудов после окислительного стресса неясен; результаты недавнего исследования позволяют предположить, что активация лектинового пути после окислительного стресса может быть опосредована связыванием MBL с цитокератинами эндотелия сосудов, а не с гликоконъюгатами (Collard et al., Am. J. Pathol. 159:1045-1054, (2001)). Результаты других исследований указывают на участие классического и альтернативного путей в патогенезе ишемии/реперфузионного повреждения, и роль лектинового пути в данном заболевании остается неоднозначной (Riedermann, N.C., et al., Am. J. Pathol. 162:363-367, 2003).

В недавнем исследовании было продемонстрировано, что MASP-1 (и возможно также MASP-3) необходим для превращения фермента альтернативного пути активации фактора D из его формы зимогена в ферментативно активную форму (смотри Takahashi M. et al., J Exp Med 207(1):29-37 (2010)). Физиологическая важность этого процесса подчеркивается отсутствием функциональной активности альтернативного пути в плазме у мышей с дефицитом MASP-1/3. Протеолитическое образование C3b из нативного C3 необходимо для функционирования альтернативного пути. Поскольку C3-конвертаза

альтернативного пути (C3bBb) содержит C3b в качестве основной субъединицы, вопрос о происхождении первого C3b в процессе альтернативного пути является загадкой, которая стимулировала многочисленные исследования.

C3 принадлежит к семейству белков (наряду с C4 и α-2 макроглобулином), имеющих редкую посттрансляционную модификацию, известную как тиоэфирная связь. Тиоэфирная группа состоит из глутамина, концевая карбонильная группа которого образует ковалентную тиоэфирную связь с сульфгидрильной группой цистеина, находящего от него через три аминокислоты. Эта связь является нестабильной, и электрофильный глутамил-тиоэфир может реагировать с нуклеофильными группами, такими как гидроксильные или аминогруппы, и, таким образом, образовывать ковалентную связь с другими молекулами. Тиоэфирная связь является достаточно стабильной, когда она секвестрирована в гидрофобном кармане интактного C3. Однако протеолитическое расщепление C3 до C3a и C3b приводит к экспонированию высокореактивной тиоэфирной связи на C3b и после нуклеофильной атаки соседних фрагментов, содержащих гидроксильные или аминогруппы, C3b становится ковалентно связанным с мишенью. Помимо его хорошо известной роли в ковалентном присоединении C3b к мишеням комплемента, тиоэфир C3 также, как считают, играют ключевую роль в запуске альтернативного пути. В соответствии с широко распространенной теорией «холостого хода» альтернативный путь запускается образованием конвертазы жидкой фазы, iC3Bb, которая образуется из C3 с гидролизованным тиоэфиром (iC3; C3(H_2O)) и фактора B (Lachmann, P.J., et al., Springer Semin. Immunopathol. 7:143-162, (1984)). C3b-подобный C3(H_2O) образуется из нативного C3 путем медленного спонтанного гидролиза внутреннего тиоэфира в белке (Pangburn, M.K., et al., J. Exp. Med. 154:856-867, 1981). За счет активности конвертазы C3(H_2O)Bb молекулы C3b откладываются на поверхности мишени, тем самым запуская альтернативный путь.

Об инициаторах активации альтернативного пути известно очень мало. Считается, что активаторы включают клеточную стенку дрожжей (зимозан), многие чистые полисахариды, кроличьи эритроциты, некоторые иммуноглобулины, вирусы, грибки, бактерии, клетки опухолей животных, паразитов и поврежденные клетки. Единственной общей чертой у этих активаторов является присутствие углевода, однако сложность и разнообразие углеводных структур затрудняют определение общих узнаваемых молекулярных детерминант. Широко признано, что активация альтернативного пути контролируется посредством точного баланса между ингибирующими регуляторными компонентами этого пути, такими как фактор H, фактор I, DAF и CR1, и пропердином, который является единственным положительным регулятором альтернативного пути (смотри Schwaeble W.J. and Reid K.B., Immunol Today 20(1):17-21 (1999)).

Помимо явно нерегулируемого механизма активации, описанного выше, альтернативный путь может также обеспечивать мощный цикл усиления для C3-конвертазы лектинового/классического пути (C4b2a), поскольку любой образовавшийся C3b может участвовать с фактором B в формировании дополнительной C3-конвертазы

(C3bBb) альтернативного пути. С3-конвертаза альтернативного пути стабилизируется за счет связывания пропердина. Пропердин продлевает период полувыведения С3-конвертазы альтернативного пути в шесть-десять раз. Добавление C3b к С3-конвертазе альтернативного пути приводит к образованию С5-конвертазы альтернативного пути.

Принято считать, что все три пути (то есть, классический, лектиновый и альтернативный) сходятся на С5, который расщепляется, с образованием продуктов со множеством провоспалительных эффектов. Конвергированный путь был назван терминальным путем комплемента. С5а является наиболее мощным анафилатоксином, вызывающим изменения тонуса гладких мышц и сосудов, а также проницаемости сосудов. Он также является сильным хемотаксином и активатором как нейтрофилов, так и моноцитов. Опосредуемая С5а клеточная активация может значительно усиливать воспалительные ответы, индуцируя высвобождение множества дополнительных медиаторов воспаления, включая цитокины, гидролитические ферменты, метаболиты арахидоновой кислоты и активные формы кислорода. Расщепление С5 приводит к образованию C5b-9, также известного как мембраноатакующий комплекс (MAC). В настоящее время имеются убедительные доказательства того, что сублитическое отложение MAC может играть важную роль в воспалении, в дополнение к его роли литического порообразующего комплекса.

Помимо ее важной роли в иммунной защите, система комплемента способствует повреждению тканей при многих клинических состояниях. Таким образом, существует острая потребность в разработке терапевтически эффективных ингибиторов комплемента для предотвращения этих неблагоприятных эффектов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное краткое изложение предназначено для представления в упрощенной форме избранных концепций, которые дополнительно описаны ниже в разделе «Подробное описание изобретения». Данное краткое изложение не предназначено для определения ключевых признаков заявленного объекта изобретения, а также не предназначено для использования в определении объема заявленного объекта изобретения. В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования повреждения микроваскулярных эндотелиальных клеток и/или образования тромбов у субъекта, страдающего от тромботической микроангиопатии (TMA), включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает от, или имеет риск развития, TMA, выбранной из группы, состоящей из гемолитического уремического синдрома (HUS), тромботической тромбоцитопенической пурпуры (TTP) и атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS). В некоторых вариантах осуществления перед введением композиции определяют, что субъект проявляет один или более симптомов, выбранных из группы, состоящей из (i) анемии, (ii) тромбоцитопении, (iii) почечной недостаточности и (iv) повышенного уровня креатинина, и композицию вводят в эффективном количестве и в

течение достаточного периода времени для ослабления указанного одного или более симптомов. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 средство представляет собой анти-MASP-2 антитело, или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 средство представляет собой анти-MASP-2 моноклональное антитело, или его фрагмент, которое специфически связывает часть SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 средство ингибирует повреждение микроваскулярных эндотелиальных клеток.

В другом аспекте изобретение относится к способу ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента у субъекта, страдающего от, или имеющего риск развития, атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS), включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 средство, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления перед введением композиции определяют, что субъект проявляет один или более симптомов, выбранных из группы, состоящей из (i) анемии, (ii) тромбоцитопении, (iii) почечной недостаточности и (iv) повышенного уровня креатинина, и композицию вводят в эффективном количестве и в течение достаточного периода времени для ослабления указанного одного или более симптомов. В одном варианте осуществления субъект страдает от, или имеет риск развития, не зависимого от фактора H aHUS. В одном варианте осуществления субъект страдает от aHUS, связанного с фактором I, фактором B или мембранным кофактором CD46. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 средство представляет собой анти-MASP-2 антитело, или его фрагмент, такое как анти-MASP-2 моноклональное антитело, или его фрагмент, которое специфически связывает часть SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 средство ингибирует повреждение микроваскулярных эндотелиальных клеток. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 средство ингибирует образование тромбов.

В другом аспекте изобретение относится к способу уменьшения вероятности того, что субъект, имеющий риск развития атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS), будет страдать от клинических симптомов, связанных с aHUS. Способ по данному аспекту изобретения включает (a) определение наличия у субъекта генетического маркера, который, как известно, связан с aHUS; (b) периодический мониторинг субъекта для определения наличия или отсутствия по меньшей мере одного симптома, выбранного из группы, состоящей из анемии, тромбоцитопении, почечной недостаточности и повышенного уровня креатинина; и (c) введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 средство, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента, при определении наличия по меньшей мере одного из анемии, тромбоцитопении, почечной недостаточности или повышенного уровня креатинина, при этом композицию вводят в эффективном количестве и в течение достаточного периода времени для ослабления указанного одного или более симптомов. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 средство

представляет собой анти-MASP-2 антитело, или его фрагмент, такое как анти-MASP-2 моноклональное антитело, или его фрагмент, которое специфически связывает часть SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления способа этап (a) включает проведение генетического скрининга образца, полученного от субъекта, и определение наличия по меньшей мере одного генетического маркера, связанного с aHUS, в гене, выбранном из группы, состоящей из генов фактора H (CFH), фактора I (CFI), фактора B (CFB) комплемента, мембранного кофактора CD46, C3, связанного с фактором H комплемента белка (CFHR1), антикоагулянтного белка тромбомодулина (THBD), связанного с фактором H комплемента белка 3 (CFHR3) и связанного с фактором H комплемента белка 4 (CFHR4). В одном варианте осуществления способ дополнительно включает мониторинг субъекта в отношении возникновения события, которое, как известно, связано с инициированием клинических симптомов aHUS, и введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 средство, до, в процессе, или после возникновения инициирующего события. В одном варианте осуществления событие, связанное с инициированием клинических симптомов aHUS, выбирают из группы, состоящей из воздействия лекарственного средства, инфекции, злокачественного новообразования, травмы, трансплантации органа или ткани и беременности. В одном варианте осуществления инфекция представляет собой бактериальную инфекцию. В одном варианте осуществления композицию вводят подкожно. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 средство ингибирует повреждение микроваскулярных эндотелиальных клеток. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 средство ингибирует образование тромбов.

В другом аспекте изобретение относится к способу ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента у субъекта, страдающего от, или имеющего риск развития, атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS) вследствие инфекции, включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 средство, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления субъект страдает от, или имеет риск развития, не энтерального aHUS, связанного с инфекцией, вызываемой S. pneumonia. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 средство представляет собой анти-MASP-2 антитело, или его фрагмент, такое как анти-MASP-2 моноклональное антитело, или его фрагмент, которое специфически связывает часть SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 средство ингибирует повреждение микроваскулярных эндотелиальных клеток. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 средство ингибирует образование тромбов.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего от атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS), включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 средство, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента, при этом введение ингибирующего MASP-2 средства выполняют способом доставки через

внутривенный катетер или другой катетер. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает лечение пациента с использованием плазмафереза. В одном варианте осуществления композицию, содержащую ингибирующее MASP-2 средство, вводят без плазмафереза. В одном варианте осуществления композицию, содержащую ингибирующее MASP-2 средство, вводят через катетер в течение первого периода времени, с последующим введением композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 средство, в течение второго периода времени, при этом в течение второго периода времени композицию вводят подкожно. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает периодическое определение уровня по меньшей мере одного фактора комплемента, при этом определение сниженного уровня по меньшей мере одного фактора комплемента в сравнении со стандартным значением, или значением у здорового субъекта, указывает на необходимость продолжения лечения композицией. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 средство представляет собой анти-MASP-2 антитело, или его фрагмент, такое как анти-MASP-2 моноклональное антитело, или его фрагмент, которое специфически связывает часть SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 средство ингибирует повреждение микроваскулярных эндотелиальных клеток. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 средство ингибирует образование тромбов.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего от тромботической тромбоцитопенической пурпуры (TTP), или имеющего симптомы, соответствующие диагнозу TTP, включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 средство, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента, при этом введение ингибирующего MASP-2 средства выполняют способом доставки через внутривенный катетер или другой катетер. В одном варианте осуществления субъект имеет по меньшей мере один или более симптомов, выбранных из группы, состоящей из поражения центральной нервной системы, тромбоцитопении, тяжелого поражения сердца, тяжелого поражения легких, инфаркта кишечника и гангрены. В одном варианте осуществления субъект имеет положительные результаты теста на наличие ингибитора ADAMTS-13, и способ дополнительно включает введение субъекту иммунодепрессанта. В одном варианте осуществления композицию, содержащую ингибирующее MASP-2 средство, вводят в течение первого периода времени без плазмафереза. В одном варианте осуществления субъект имеет положительные результаты теста на наличие ингибитора ADAMTS-13, и способ дополнительно включает введение ADAMTS-13. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает лечение пациента с использованием плазмафереза. В одном варианте осуществления композицию, содержащую ингибирующее MASP-2 средство, вводят в сочетании с плазмаферезом. В одном варианте осуществления композицию, содержащую ингибирующее MASP-2 средство, вводят через катетер в течение первого периода времени, с последующим введением композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 средство, в течение второго периода времени, при

этом в течение второго периода времени композицию вводят подкожно. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает периодическое определение уровня по меньшей мере одного фактора комплемента, при этом определение сниженного уровня по меньшей мере одного фактора комплемента в сравнении со стандартным значением, или значением у здорового субъекта, указывает на необходимость продолжения лечения композицией. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 средство представляет собой анти-MASP-2 антитело, или его фрагмент, такое как анти-MASP-2 моноклональное антитело, или его фрагмент, которое специфически связывает часть SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 средство ингибирует повреждение микроваскулярных эндотелиальных клеток. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 средство ингибирует образование тромбов.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего от рефрактерной тромботической тромбоцитопенической пурпуры (TTP), включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 средство, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления композицию вводят подкожно. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает периодическое определение уровня по меньшей мере одного фактора комплемента, при этом определение сниженного уровня по меньшей мере одного фактора комплемента в сравнении со стандартным значением, или значением у здорового субъекта, указывает на необходимость продолжения лечения композицией. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 средство представляет собой анти-MASP-2 антитело, или его фрагмент, такое как анти-MASP-2 моноклональное антитело, или его фрагмент, которое специфически связывает часть SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 средство ингибирует повреждение микроваскулярных эндотелиальных клеток. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 средство ингибирует образование тромбов.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента у субъекта, страдающего от, или имеющего риск развития, тромботической микроангиопатии (TMA), при этом TMA представляет собой по меньшей мере одно из (i) TMA вследствие рака; (ii) TMA вследствие химиотерапии или (iii) TMA вследствие трансплантации, включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 средство, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает от, или имеет риск развития, TMA вследствие рака, и ингибирующее MASP-2 средство вводят субъекту системно в количестве, эффективном для уменьшения риска развития TMA или уменьшения степени тяжести TMA. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает от, или имеет риск развития, TMA вследствие химиотерапии, и ингибирующее MASP-2 средство вводят субъекту системно до, в процессе, или после химиотерапии в количестве, эффективном для уменьшения риска развития TMA или уменьшения степени тяжести TMA. В

некоторых вариантах осуществления субъект страдает от, или имеет риск развития, ТМА вследствие трансплантации, и ингибирующее MASP-2 средство вводят субъекту системно до, в процессе, или после процедуры трансплантации в количестве, эффективном для уменьшения риска развития ТМА или уменьшения степени тяжести ТМА. В некоторых вариантах осуществления процедура трансплантации представляет собой аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления субъект получал ранее, или получает в настоящее время, лечение ингибитором терминального компонента комплемента, который ингибирует расщепление белка С5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту ингибитора терминального компонента комплемента, который ингибирует расщепление белка С5 комплемента, например, гуманизированного анти-С5 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, такого как экулизумаб.

В другом аспекте изобретение относится к способу ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента у субъекта, страдающего от, или имеющего риск развития, синдрома Апшо-Шульмана (USS), включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 средство, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта, имеющего риск развития USS, включающее введение в течение определенного периода времени определенного количества ингибирующего MASP-2 средства, эффективного для ослабления или предотвращения одного или более клинических симптомов, связанных с TTP. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает периодический мониторинг субъекта и введение ингибирующего MASP-2 средства при наличии события, которое, как известно, связано с инициированием клинических симптомов TTP. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает периодический мониторинг субъекта и введение ингибирующего MASP-2 средства при определении наличия анемии, тромбоцитопении или повышенного уровня креатинина. В некоторых вариантах осуществления субъект получал ранее, или получает в настоящее время, лечение ингибитором терминального компонента комплемента, который ингибирует расщепление белка С5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту ингибитора терминального компонента комплемента, который ингибирует расщепление белка С5 комплемента, например, гуманизированного анти-С5 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, такого как экулизумаб.

В другом аспекте изобретение относится к способу ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента у субъекта, страдающего от болезни Дегоса, включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 средство, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления субъект получал ранее, или получает в настоящее время, лечение ингибитором терминального компонента

комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту ингибитора терминального компонента комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента, например, гуманизированного анти-C5 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, такого как экулизумаб.

В другом аспекте изобретение относится к способу ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента у субъекта, страдающего от катастрофического антифосфолипидного синдрома (CAPS), включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 средство, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления субъект получал ранее, или получает в настоящее время, лечение ингибитором терминального компонента комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту ингибитора терминального компонента комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента, например, гуманизированного анти-C5 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, такого как экулизумаб.

В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых способов по изобретению ингибирующее MASP-2 средство представляет собой ингибирующее MASP-2 антитело, или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело имеет сниженную эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело существенно не ингибирует классический путь. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 средство представляет собой анти-MASP-2 моноклональное антитело, или его фрагмент, которое специфически связывает часть SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления анти-MASP-2 антитело, или его фрагмент, выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела, имеющего сниженную эффекторную функцию, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', $F(ab)_2$ и $F(ab')_2$. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой одноцепочечную молекулу. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело выбирают из группы, состоящей из молекулы IgG1, IgG2 и молекулы IgG4. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой молекулу IgG4 с мутацией S228P. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело связывает человеческий MASP-2 с величиной K_D, составляющей 10 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело связывает эпитоп в домене CCP1 MASP-2. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует отложение C3b в in vitro анализе в 1% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 10 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело

ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее.

В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых способов по изобретению ингибирующее MASP-2 моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит: (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: i) CDR-H1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 31-35 в SEQ ID NO: 67; и ii) CDR-H2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-65 в SEQ ID NO: 67; и iii) CDR-H3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 95-102 в SEQ ID NO: 67, и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую: i) CDR-L1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 24-34 в SEQ ID NO: 70; и ii) CDR-L2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-56 в SEQ ID NO: 70; и iii) CDR-L3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 89-97 в SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 моноклональное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически узнает по меньшей мере часть эпитопа, узнаваемого эталонным антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 70.

Другой аспект изобретения относится к способам ингибирования образования тромбов у субъекта, страдающего от атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS), включающим введение субъекту ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке субъекта, страдающего от aHUS, на по меньшей мере 40% в сравнении с контрольной сывороткой. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке субъекта, страдающего от aHUS, на уровне, по меньшей мере на 20% большем (например, по меньшей мере на 30% большем, по меньшей мере на 40% большем или по меньшей мере на 50% большем), чем его ингибирующий эффект на отложение C5b-9 в сыворотке от того же субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет aHUS в острой фазе. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет aHUS в фазе ремиссии. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой моноклональное антитело, или его фрагмент, которое специфически связывает часть SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело, или его фрагмент, выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела, имеющего сниженную эффекторную функцию, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой фрагмент

антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', $F(ab)_2$ и $F(ab')_2$. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой одноцепочечную молекулу. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело выбирают из группы, состоящей из молекулы IgG1, IgG2 и молекулы IgG4. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой молекулу IgG4 с мутацией S228P. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело связывает человеческий MASP-2 с величиной K_D, составляющей 10 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело связывает эпитоп в домене CCP1 MASP-2. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует отложение C3b в in vitro анализе в 1% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 10 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит: (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: i) CDR-H1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 31-35 в SEQ ID NO: 67; и ii) CDR-H2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-65 в SEQ ID NO: 67; и iii) CDR-H3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 95-102 в SEQ ID NO: 67, и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую: i) CDR-L1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 24-34 в SEQ ID NO: 70; и ii) CDR-L2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-56 в SEQ ID NO: 70; и iii) CDR-L3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 89-97 в SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 моноклональное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически узнает по меньшей мере часть эпитопа, узнаваемого эталонным антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 70.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего от устойчивого к плазмотерапии aHUS, включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой анти-MASP-2 моноклональное антитело, или его фрагмент, которое специфически связывает человеческий MASP-2. В одном варианте осуществления антитело, или его фрагмент, выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела, имеющего сниженную эффекторную функцию, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела. В одном варианте осуществления субъект получал ранее, или

получает в настоящее время, лечение ингибитором терминального компонента комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента, например, при этом ингибитор терминального компонента комплемента представляет собой гуманизированное анти-C5 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает лечение пациента с использованием плазмафереза. В одном варианте осуществления композицию, содержащую ингибирующее MASP-2 антитело, вводят без плазмафереза.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего от ТМА, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой анти-MASP-2 моноклональное антитело, или его фрагмент, которое специфически связывает человеческий MASP-2. В одном варианте осуществления антитело, или его фрагмент, выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела, имеющего сниженную эффекторную функцию, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела. В одном варианте осуществления субъект получал ранее, или получает в настоящее время, лечение ингибитором терминального компонента комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В одном варианте осуществления субъект страдает от ТМА, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, которая устойчива к лечению с использованием переливания тромбоцитарной массы и/или устойчива к лечению с использованием плазмафереза.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят в количестве, эффективном для улучшения по меньшей мере одного или более клинических параметров, связанных с ТМА, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, например, увеличения количества тромбоцитов (например, увеличения по меньшей мере в два, по меньшей мере в три, по меньшей мере в четыре раза количества тромбоцитов до начала лечения), повышения уровня гаптоглобина и/или снижения уровня лактатдегидрогеназы.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта-человека, страдающего от стойкой ТМА, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток (HSCT-TMA), включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает идентификацию субъекта-человека, имеющего стойкую ТМА, связанную с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, перед этапом введения субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой моноклональное антитело, или его фрагмент, которое специфически связывает человеческий MASP-2. В одном варианте осуществления антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела, имеющего сниженную эффекторную функцию, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело существенно не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят пациенту без плазмафереза. В одном варианте осуществления субъект получал ранее, или получает в настоящее время, лечение с использованием гуманизированного анти-C5 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, например, при этом ингибитор терминального компонента комплемента представляет собой гуманизированное анти-C5 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту системно. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, вводят в количестве, эффективном для улучшения по меньшей мере одного или более из следующих клинических параметров, связанных с TMA, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, например, для: (i) увеличения количества тромбоцитов (например, увеличения по меньшей мере в два, по меньшей мере в три, по меньшей мере в четыре раза количества тромбоцитов до начала лечения)); (ii) повышения уровня гаптоглобина; (iii) снижения уровня лактатдегидрогеназы (LDH) и/или (iv) снижения уровня креатинина.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта-человека, страдающего от, или имеющего риск развития, реакции трансплантат против хозяина (GVHD), включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления субъект получал ранее, или получает в настоящее время, или будет получать трансплантат гемопоэтических стволовых клеток. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает идентификацию субъекта-человека, страдающего от, или имеющего риск развития, реакции трансплантат против хозяина, перед этапом введения субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном варианте

осуществления ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой моноклональное антитело, или его фрагмент, которое специфически связывает человеческий MASP-2. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело, или его фрагмент, выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела, имеющего сниженную эффекторную функцию, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело существенно не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту системно. В одном варианте осуществления субъект страдает от острой GVHD. В одном варианте осуществления субъект страдает от резистентной к стероидам GVHD. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения, предотвращения или ослабления одного или более неврологических симптомов, связанных с реакцией трансплантат против хозяина или TMA, включающему введение субъекту, который нуждается в этом, композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления один или более неврологических симптомов, связанных с реакцией трансплантат против хозяина или TMA, выбирают из группы, состоящей из астении, парестезии, тетраплегии, сенсорно-двигательных нарушений, вегето-сосудистой полиневропатии и/или нейрогенного мочевого пузыря. В одном варианте осуществления субъект получил трансплантат гемопоэтических стволовых клеток, и субъект страдает от одного или более неврологических симптомов, выбранных из группы, состоящей из парестезии, тетраплегии и нейрогенного мочевого пузыря. В одном варианте осуществления субъект получил трансплантат гемопоэтических стволовых клеток и страдает от реакции трансплантат против хозяина. В одном варианте осуществления субъект получил трансплантат гемопоэтических стволовых клеток и страдает от HSCT-TMA. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой моноклональное антитело, или его фрагмент, которое специфически связывает человеческий MASP-2. В одном варианте осуществления антитело, или его фрагмент, выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела, имеющего сниженную эффекторную функцию, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело существенно не ингибирует классический путь. В одном варианте

осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту системно. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает идентификацию субъекта-человека, страдающего от одного или более неврологических симптомов, связанных с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, перед этапом введения субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта-человека, страдающего от, или имеющего риск развития, диффузного альвеолярного кровотечения (DAH), связанного с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления субъект получал ранее, или получает в настоящее время, или будет получать трансплантат гемопоэтических стволовых клеток. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает идентификацию субъекта-человека, страдающего от, или имеющего риск развития, диффузного альвеолярного кровотечения (DAH), перед этапом введения субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой моноклональное антитело, или его фрагмент, которое специфически связывает человеческий MASP-2. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело, или его фрагмент, выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела, имеющего сниженную эффекторную функцию, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело существенно не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту системно. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3,

с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70. В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции для ингибирования неблагоприятных эффектов MASP-2-зависимой активации комплемента, содержащей терапевтически эффективное количество ингибирующего MASP-2 средства, такого как ингибирующее MASP-2 антитело, и фармацевтически приемлемый носитель. Также предложены способы производства лекарственного препарата для использования в ингибировании неблагоприятных эффектов MASP-2-зависимой активации комплемента у живых субъектов, которые нуждаются в этом, содержащего терапевтически эффективное количество ингибирующего MASP-2 средства в фармацевтическом носителе. Также предложены способы производства лекарственных препаратов для использования в ингибировании MASP-2-зависимой активации комплемента с целью лечения каждого из состояний, заболеваний и нарушений, описанных ниже в настоящем документе.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта-человека, страдающего от, или имеющего риск развития, веноокклюзионной болезни (VOD), связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления субъект получал ранее, или получает в настоящее время, или будет получать трансплантат гемопоэтических стволовых клеток. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает идентификацию субъекта-человека, страдающего от, или имеющего риск развития, веноокклюзионной болезни (VOD), перед этапом введения субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой моноклональное антитело, или его фрагмент, которое специфически связывает человеческий MASP-2. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело, или его фрагмент, выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела, имеющего сниженную эффекторную функцию, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело существенно не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту системно. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70. В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции для ингибирования

неблагоприятных эффектов MASP-2-зависимой активации комплемента, содержащей терапевтически эффективное количество ингибирующего MASP-2 средства, такого как ингибирующее MASP-2 антитело, и фармацевтически приемлемый носитель. Также предложены способы производства лекарственного препарата для использования в ингибировании неблагоприятных эффектов MASP-2-зависимой активации комплемента у живых субъектов, которые нуждаются в этом, содержащего терапевтически эффективное количество ингибирующего MASP-2 средства в фармацевтическом носителе. Также предложены способы производства лекарственных препаратов для использования в ингибировании MASP-2-зависимой активации комплемента с целью лечения каждого из состояний, заболеваний и нарушений, описанных ниже в настоящем документе.

Способы, композиции и лекарственные препараты по изобретению могут быть использованы для ингибирования неблагоприятных эффектов MASP-2-зависимой активации комплемента in vivo у субъектов-млекопитающих, включая людей, страдающих от, или имеющих риск развития, тромботической микроангиопатии (TMA), и/или субъекта, страдающего от, или имеющего риск развития, GVHD, и/или субъекта, страдающего от, или имеющего риск развития, диффузного альвеолярного кровотечения после трансплантации стволовых клеток, и/или субъекта, страдающего от, или имеющего риск развития, вено окклюзионной болезни (VOD), как описано далее в настоящем документе.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Вышеизложенные аспекты и многие сопутствующие преимущества настоящего изобретения станут более понятными при изучении следующего далее подробного описания в сочетании с прилагаемыми чертежами, в которых:

ФИГУРА 1 представляет собой диаграмму, иллюстрирующую геномную структуру человеческого MASP-2;

ФИГУРА 2A представляет собой схематическую диаграмму, иллюстрирующую доменную структуру человеческого белка MASP-2;

ФИГУРА 2B представляет собой схематическую диаграмму, иллюстрирующую доменную структуру человеческого белка MAp19;

ФИГУРА 3 представляет собой диаграмму, иллюстрирующую стратегию нокаута мышиного MASP-2;

ФИГУРА 4 представляет собой диаграмму, иллюстрирующую конструкт минигена человеческого MASP-2;

ФИГУРА 5A представляет результаты, показывающие, что дефицит MASP-2 приводит к утрате опосредуемой лектиновым путем активации C4, что определяют по отсутствию отложения C4b на маннане, как описано в примере 2;

ФИГУРА 5B представляет результаты, показывающие, что дефицит MASP-2 приводит к утрате опосредуемой лектиновым путем активации C4, что определяют по отсутствию отложения C4b на зимозане, как описано в примере 2;

ФИГУРА 5C представляет результаты, показывающие относительные уровни

активации C4 в образцах сыворотки, полученных от мышей линий MASP-2+/-; MASP-2-/- и дикого типа, что определяют по отложению C4b на маннане и на зимозане, как описано в примере 2;

ФИГУРА 6 представляет результаты, показывающие, что добавление мышиного рекомбинантного MASP-2 к MASP-2-/- образцам сыворотки приводит к восстановлению опосредованной лектиновым путем активации C4 зависимым от концентрации белка образом, что определяют по отложению C4b на маннане, как описано в примере 2;

ФИГУРА 7 представляет результаты, показывающие, что классический путь является функциональным у мышей линии MASP-2-/-, как описано в примере 8;

ФИГУРА 8A представляет результаты, показывающие, что анти-MASP-2 Fab2 антитело № 11 ингибирует образование C3-конвертазы, как описано в примере 10;

ФИГУРА 8B представляет результаты, показывающие, что анти-MASP-2 Fab2 антитело № 11 связывает естественный крысиный MASP-2, как описано в примере 10;

ФИГУРА 8C представляет результаты, показывающие, что анти-MASP-2 Fab2 антитело № 41 ингибирует расщепление C4, как описано в примере 10;

ФИГУРА 9 представляет результаты, показывающие, что все протестированные анти-MASP-2 Fab2 антитела, которые ингибировали образование C3-конвертазы, также, как установлено, ингибируют расщепление C4, как описано в примере 10;

ФИГУРА 10 представляет собой диаграмму, иллюстрирующую рекомбинантные полипептиды, полученные из крысиного MASP-2, которые были использованы для картирования эпитопов анти-MASP-2 блокирующих Fab2 антител, как описано в примере 11;

ФИГУРА 11 представляет результаты, показывающие связывание анти-MASP-2 Fab2 № 40 и № 60 с полипептидами крысиного MASP-2, как описано в примере 11;

ФИГУРА 12 представляет результаты, показывающие клиренс азота мочевины крови у мышей дикого типа (+/+) и мышей MASP-2 (-/-) через 24 и 48 часов после реперфузии в модели ишемии/реперфузионного повреждения почки, как описано в примере 12;

ФИГУРА 13A представляет результаты, показывающие исходные уровни белка VEGF в RPE-хориоидном комплексе, полученном от мышей дикого типа (+/+) и мышей MASP-2 (-/-), как описано в примере 13;

ФИГУРА 13B представляет результаты, показывающие уровни белка VEGF в RPE-хориоидном комплексе в день 3 у мышей дикого типа (+/+) и мышей MASP-2 (-/-) после индуцированного лазером повреждения в модели дегенерации желтого пятна, как описано в примере 13;

ФИГУРА 14 представляет результаты, показывающие средний объем хориоидальной неоваскуляризации (CNV) в день семь после индуцированного лазером повреждения у мышей дикого типа (+/+) и мышей MASP-2 (-/-), как описано в примере 13;

ФИГУРЫ 15A и 15B представляют кривые доза-ответ для ингибирования отложения C4b (ФИГ. 15A) и ингибирования активации тромбина (ФИГ. 15B) после

введения анти-MASP-2 Fab2 антитела в нормальной крысиной сыворотке, как описано в примере 14;

ФИГУРЫ 16A и 16B представляют измеренные показатели агрегации тромбоцитов (выраженные в виде площади агрегатов) у мышей MASP-2 (-/-) (ФИГ. 16B) в сравнении с агрегацией тромбоцитов у не подвергнутых воздействию мышей дикого типа и мышей дикого типа, у которых путь комплемента ингибирован за счет деплеторного реагента, фактора яда кобры (CVF), и ингибитора терминальных компонентов пути (антагониста C5aR), (ФИГУРА 16A) в локализованной реакции Шварцмана, являющейся моделью диссеминированной внутрисосудистой коагуляции, как описано в примере 15;

ФИГУРА 17 графически представляет уровни азота мочевины крови (BUN), измеренные или у ДТ (+/+) (B6), или у MASP-2 (-/-), мышей-реципиентов трансплантата донорских почек ДТ (+/+), как описано в примере 16;

ФИГУРА 18 графически представляет выживаемость, в процентах, мышей ДТ (+/+) и MASP-2 (-/-) в зависимости от количества дней после микробной инфекции в модели перевязки и прокола слепой кишки (CLP), как описано в примере 17;

ФИГУРА 19 графически представляет количество бактерий, измеренное у мышей ДТ (+/+) и MASP-2 (-/-) после микробной инфекции в модели перевязки и прокола слепой кишки (CLP), как описано в примере 17;

ФИГУРА 20 представляет собой график Каплана-Мейера, показывающий выживаемость, в процентах, мышей ДТ (+/+), MASP-2 (-/-) и C3 (-/-) через шесть дней после заражения путем интраназального введения Pseudomonas aeruginosa, как описано в примере 18;

ФИГУРА 21 графически представляет уровень отложения C4b, измеренный в виде % от контроля, в образцах, полученных в разные моменты времени после подкожного введения либо 0,3 мг/кг, либо 1,0 мг/кг, мышиного анти-MASP-2 моноклонального антитела, у мышей ДТ, как описано в примере 19;

ФИГУРА 22 графически представляет уровень отложения C4b, измеренный в виде % от контроля, в образцах, полученных в разные моменты времени после в/б введения 0,6 мг/кг мышиного анти-MASP-2 моноклонального антитела, у мышей ДТ, как описано в примере 19;

ФИГУРА 23 графически представляет средний объем хориоидальной неоваскуляризации (CNV) в день семь после индуцированного лазером повреждения у мышей ДТ (+/+), предварительно получивших одну в/б инъекцию 0,3 мг/кг или 1,0 мг/кг мышиного анти-MASP-2 моноклонального антитела, как описано в примере 20;

ФИГУРА 24A графически представляет выживаемость, в процентах, мышей MASP-2 (-/-) и ДТ (+/+) после инфицирования 5×10^8/100 мкл КОЕ N. meningitidis, как описано в примере 21;

ФИГУРА 24B графически представляет log КОЕ/мл N. meningitidis, извлеченных в разные моменты времени из образцов крови, полученных от мышей MASP-2 KO (-/-) и ДТ (+/+), инфицированных 5×10^8/100 мкл КОЕ N. meningitidis, как описано в примере 21;

ФИГУРА 25A графически представляет выживаемость, в процентах, мышей MASP-2 KO (-/-) и ДТ (+/+) после инфицирования 2×10^8 КОЕ/100 мкл N. meningitidis, как описано в примере 21;

ФИГУРА 25B графически представляет log КОЕ/мл N. meningitidis, извлеченных в разные моменты времени из образцов крови, полученных от мышей WT (+/+), инфицированных 2×10^8 КОЕ/100 мкл N. meningitidis, как описано в примере 21;

ФИГУРА 25C графически представляет log КОЕ/мл N. meningitidis, извлеченных в разные моменты времени из образцов крови, полученных от мышей MASP-2 (-/-), инфицированных 2×10^8 КОЕ/100 мкл N. meningitidis, как описано в примере 21;

ФИГУРА 26A графически представляет результаты анализа отложения C3b, демонстрирующие, что у мышей MASP-2 (-/-) сохраняется функциональный классический путь, как описано в примере 22;

ФИГУРА 26B графически представляет результаты анализа отложения C3b на покрытых зимозаном планшетах, демонстрирующие, что у мышей MASP-2 (-/-) сохраняется функциональный альтернативный путь, как описано в примере 22;

ФИГУРА 27A графически представляет индуцированную миокардиальной ишемией/реперфузионным повреждением (MIRI) потерю ткани после перевязки левой передней нисходящей ветви коронарной артерии (LAD) и реперфузии у мышей C4 (-/-) (n=6) и соответствующих контрольных однопометников ДТ (n=7), с демонстрацией подвергаемой риску области (ПРО) и размера очага омертвения (ИНФ), как описано в примере 22;

ФИГУРА 27B графически представляет размер очага омертвения (ИНФ) в зависимости от подвергаемой риску области (ПРО) у мышей C4 (-/-) и ДТ, подвергнутых воздействию, как описано на ФИГУРЕ 42A, это показывает, что мыши C4 (-/-) также подвержены MIRI, как и контроли ДТ (пунктирная линия), как описано в примере 22;

ФИГУРА 28A графически представляет результаты анализа отложения C3b с использованием сыворотки от мышей ДТ, C4 (-/-) и сыворотки от мышей C4 (-/-), преинкубированной с маннаном, как описано в примере 22;

ФИГУРА 28B графически представляет результаты анализа отложения C3b в сыворотке мышей ДТ, C4 (-/-) и MASP-2 (-/-), смешанной с мАт против мышиного MASP-2 (мАт M11) в разных концентрациях, как описано в примере 22;

ФИГУРА 28C графически представляет результаты анализа отложения C3b в человеческой сыворотке ДТ (достаточное количество C4) и дефицитной по C4 сыворотке, а также сыворотке субъектов с дефицитом C4, преинкубированной с маннаном, как описано в примере 22;

ФИГУРА 28D графически представляет результаты анализа отложения C3b в человеческой сыворотке ДТ (достаточное количество C4) и сыворотке субъектов с дефицитом C4, смешанной с мАт против человеческого MASP-2 (мАт H3), как описано в примере 22;

ФИГУРА 29A графически представляет результаты сравнительного анализа

активности C3-конвертазы в плазме от разных дефицитных по комплементу линий мышей, протестированных либо в условиях анализа, специфических для лектинового пути активации, либо в условиях анализа, специфических для классического пути активации комплемента, как описано в примере 22;

ФИГУРА 29B графически представляет кинетику с временным разрешением активности C3-конвертазы в плазме от мышей разных дефицитных по комплементу линий, протестированных в условиях анализа, специфических для лектинового пути активации комплемента, как описано в примере 22;

ФИГУРА 30 показывает результаты вестерн-блот анализа, демонстрирующие активацию человеческого C3, о чем свидетельствует наличие α'-цепи, тромбиновыми субстратами FXIa и FXa, как описано в примере 23;

ФИГУРА 31 показывает результаты анализа отложения C3 в образцах сыворотки, полученных от мышей ДТ, MASP-2 (-/-), F11(-/-), F11(-/-)/C4 (-/-) и C4 (-/-), как описано в примере 23;

ФИГУРА 32A представляет собой график Каплана-Мейера, показывающий выживаемость, в процентах, с течением времени после воздействия излучения в дозе 7,0 Гр для контрольных мышей и мышей, получавших антитело против мышиного MASP-2 (мАт M11) или антитело против человеческого MASP-2 (мАт H6), как описано в примере 29;

ФИГУРА 32B представляет собой график Каплана-Мейера, показывающий выживаемость, в процентах, с течением времени после воздействия излучения в дозе 6,5 Гр для контрольных мышей и мышей, получавших антитело против мышиного MASP-2 (мАт M11) или антитело против человеческого MASP-2 (мАт H6), как описано в примере 29;

ФИГУРА 33 представляет собой график Каплана-Мейера, показывающий выживаемость, в процентах, мышей MASP-2 KO и ДТ после введения инфекционной дозы $2{,}6\times10^{7}$ КОЕ N. meningitidis серогруппы A Z2491, который демонстрирует, что мыши с дефицитом MASP-2 защищены от гибели, вызываемой N. meningitidis, как описано в примере 30;

ФИГУРА 34 представляет собой график Каплана-Мейера, показывающий выживаемость, в процентах, мышей MASP-2 KO и ДТ после введения инфекционной дозы 6×10^{6} КОЕ N. meningitidis серогруппы B штамма MC58, который демонстрирует, что мыши с дефицитом MASP-2 защищены от гибели, вызываемой N. meningitidis серогруппы B штамма MC58, как описано в примере 30;

ФИГУРА 35 графически представляет log КОЕ/мл N. meningitidis серогруппы B штамма MC58, извлеченных в разные моменты времени из образцов крови, полученных от мышей MASP-2 KO и ДТ после в/б инфицирования 6×10^{6} КОЕ N. meningitidis серогруппы B штамма MC58 (n=3 в разные моменты времени для обеих групп мышей, результаты представлены в виде средних значений ± SEM); результаты показывают, что, хотя мыши MASP-2 KO были инфицированы той же дозой N. meningitidis серогруппы B

штамма MC58, что и мыши ДТ, мыши MASP-2 KO имели повышенный клиренс бактерий в сравнении с ДТ, как описано в примере 30;

ФИГУРА 36 графически представляет средний балльный показатель нездоровья мышей MASP-2 и ДТ через 3, 6, 12 и 24 часа после инфицирования 6×10^6 КОЕ/100 мкл N. meningitidis серогруппы B штамма MC58, демонстрирующий, что мыши с дефицитом MASP-2 имели высокую устойчивость к инфекции, с намного более низкими показателями нездоровья через 6 часов, как описано в примере 30;

ФИГУРА 37 представляет собой график Каплана-Мейера, показывающий выживаемость, в процентах, мышей после введения инфекционной дозы 4×10^6/100 мкл КОЕ N. meningitidis серогруппы B штамма MC58, с последующим введением через 3 часа после инфицирования либо ингибирующего анти-MASP-2 антитела (1 мг/кг), либо контрольного по изотипу антитела; результаты показывают, что анти-MASP-2 антитело является эффективным для лечения и повышения выживаемости у субъектов, инфицированных N. meningitidis, как описано в примере 31;

ФИГУРА 38 графически представляет log КОЕ/мл жизнеспособных бактерий N. meningitidis серогруппы B-MC58, извлеченных в разные моменты времени из человеческой сыворотки с концентрацией 20% после в/б инфицирования $6,5\times10^6$ КОЕ/100 мкл N. meningitidis серогруппы B штамма MC58, через 0, 30, 60 и 90 минут после инкубации в присутствии: (A) нормальной человеческой сыворотки (НЧС) плюс человеческое анти-MASP-2 антитело; (B) нормальной человеческой сыворотки (НЧС) плюс контрольное по изотипу антитело; (C) MBL-/- человеческой сыворотки; (D) нормальной человеческой сыворотки (НЧС) и (E) инактивированной нагреванием нормальной человеческой сыворотки (НЧС); результаты показывают, что зависимое от комплемента уничтожение N. meningitidis в человеческой сыворотке было значительно повышено при добавлении человеческого анти-MASP-2 антитела, как описано в примере 32;

ФИГУРА 39 графически представляет log КОЕ/мл жизнеспособных бактерий N. meningitidis серогруппы B-MC58, извлеченных в разные моменты времени из образцов мышиной сыворотки; результаты показывают, что сыворотка мышей MASP-2-/- имеет более высокий уровень бактерицидной активности в отношении N. meningitidis, чем сыворотка мышей ДТ, как описано в примере 32;

ФИГУРА 40 графически представляет гемолиз (определенный на основании высвобождения гемоглобина из лизированных мышиных эритроцитов (Crry/C3-/-) в супернатант, измеренного фотометрическим методом) покрытых маннаном мышиных эритроцитов человеческой сывороткой в диапазоне концентраций сыворотки. Протестированные сыворотки включали инактивированную нагреванием (ИН) НЧС, MBL-/-, НЧС+анти-MASP-2 антитело и НЧС контроль, как описано в примере 33;

ФИГУРА 41 графически представляет гемолиз (определенный на основании высвобождения гемоглобина из лизированных эритроцитов мышей ДТ в супернатант, измеренного фотометрическим методом) не покрытых мышиных эритроцитов

человеческой сывороткой в диапазоне концентраций сыворотки. Протестированные сыворотки включали инактивированную нагреванием (ИН) НЧС, MBL-/-, НЧС+анти-MASP-2 антитело и НЧС контроль; результаты показывают, что ингибирование MASP-2 ингибирует опосредованный комплементом лизис эритроцитов не сенсибилизированных мышей ДТ, как описано в примере 33;

ФИГУРА 42 графически представляет гемолиз (определенный на основании высвобождения гемоглобина из лизированных мышиных эритроцитов (CD55/59-/-) в супернатант, измеренного фотометрическим методом) не покрытых мышиных эритроцитов человеческой сывороткой в диапазоне концентраций сыворотки. Протестированные сыворотки включали инактивированную нагреванием (ИН) НЧС, MBL-/-, НЧС+анти-MASP-2 антитело и НЧС контроль, как описано в примере 33;

ФИГУРА 43 графически представляет выживаемость, в процентах, в зависимости от времени (дни) после воздействия излучения в дозе 8,0 Гр для контрольных мышей и мышей, получавших антитело против человеческого MASP-2 (мАт H6), как описано в примере 34;

ФИГУРА 44 графически представляет время до начала микроваскулярной окклюзии после инъекции LPS мышам MASP-2-/- и ДТ; показана процентная доля мышей с образованием тромбов, измеренным в течение 60 минут; результаты показывают, что образование тромбов происходит через 15 минут у мышей ДТ, при этом у вплоть до 80% мышей ДТ происходит образование тромбов за 60 минут; напротив, ни у одной из мышей MASP-2-/- не наблюдали образование тромбов в течение 60-минутного периода времени (логарифмический ранговый критерий: p=0,0005), как описано в примере 35;

ФИГУРА 45 графически представляет выживаемость, в процентах, для получавших солевой раствор контрольных мышей (n=5) и получавших анти-MASP-2 антитело мышей (n=5) в модели STX/LPS-индуцированного HUS с течением времени (часы); результаты показывают, что все контрольные мыши погибли через 42 часа, при этом, напротив, 100% получавших анти-MASP-2 антитело мышей выживали в течение всего эксперимента, как описано в примере 36;

ФИГУРА 46 графически представляет, в виде функции от времени после индукции повреждения, процентную долю мышей с микроваскулярной окклюзией в модели индуцированного FITC/декстраном и УФ повреждения после обработки контрольным по изотипу антителом или антителом против человеческого MASP-2 мАт H6 (10 мг/кг), введенным за 16 часов и 1 час до инъекции FITC/декстрана, как описано в примере 37;

ФИГУРА 47 графически представляет время до окклюзии, в минутах, для мышей, получавших антитело против человеческого MASP-2 (мАт H6) и контрольное по изотипу антитело, при этом данные представлены в виде диаграммы разброса со средними значениями (горизонтальные черты) и планками стандартных погрешностей (вертикальные черты). Для статистического анализа данных использовали непарный критерий Стьюдента; при этом символ «*» соответствует p=0,0129, как описано в примере 37; и

ФИГУРА 48 графически представляет время до окклюзии, в минутах, для мышей дикого типа, мышей MASP-2 KO и мышей дикого типа, предварительно получавших антитело против человеческого MASP-2 (мАт H6), введенное в/б в дозе 10 мг/кг за 16 часов до, и вновь за 1 час до, индукции тромбоза в модели тромбоза, представляющей собой индуцированное FITC-декстраном/светом повреждение эндотелиальных клеток при низкой интенсивности света (800-1500), как описано в примере 37;

ФИГУРА 49 представляет собой график Каплана-Мейера, показывающий процентную долю мышей с тромбами, в зависимости от времени, в модели индуцированной FITC-декстраном тромботической микроангиопатии у мышей, получавших возрастающие дозы человеческого ингибирующего MASP-2 антитела (мАт H6), или контрольное по изотипу антитело, как описано в примере 39;

ФИГУРА 50 графически представляет среднее время (минуты) до начала образования тромбов в зависимости от дозы мАт H6 (*$p<0,01$ в сравнении с контролем), как описано в примере 39;

ФИГУРА 51 представляет собой график Каплана-Мейера, показывающий процентную долю мышей с микроваскулярной окклюзией, в зависимости от времени, в модели индуцированной FITC-декстраном тромботической микроангиопатии у мышей, получавших возрастающие дозы ингибирующего человеческий MASP-2 антитела (мАт H6), или контрольное по изотипу антитело, как описано в примере 39;

ФИГУРА 52 графически представляет среднее время до микроваскулярной окклюзии в зависимости от дозы мАт H6 (*$p<0,05$ в сравнении с контролем), как описано в примере 39;

ФИГУРА 53A графически представляет уровень отложения MAC в присутствии или в отсутствие человеческого моноклонального антитела против MASP-2 (OMS646) в условиях анализа, специфических для лектинового пути; результаты показывают, что OMS646 ингибирует опосредуемое лектином отложение MAC с величиной IC_{50}, составляющей примерно 1 нМ, как описано в примере 40;

ФИГУРА 53B графически представляет уровень отложения MAC в присутствии или в отсутствие человеческого моноклонального антитела против MASP-2 (OMS646) в условиях анализа, специфических для классического пути; результаты показывают, что OMS646 не ингибирует опосредуемое классическим путем отложение MAC, как описано в примере 40;

ФИГУРА 53C графически представляет уровень отложения MAC в присутствии или в отсутствие человеческого моноклонального антитела против MASP-2 (OMS646) в условиях анализа, специфических для альтернативного пути; результаты показывают, что OMS646 не ингибирует опосредуемое альтернативным путем отложение MAC, как описано в примере 40;

ФИГУРА 54 графически представляет фармакокинетический (ФК) профиль человеческого моноклонального антитела против MASP-2 (OMS646) у мышей, показывающий концентрацию OMS646 (среднее для n=3 животных/группе) в зависимости

от времени после введения в указанной дозе, как описано в примере 40;

ФИГУРА 55A графически представляет фармакодинамический (ФД) ответ на человеческое моноклональное антитело против MASP-2 (OMS646), измеренный в виде падения системной активности лектинового пути у мышей после внутривенного введения, как описано в примере 40;

ФИГУРА 55B графически представляет фармакодинамический (ФД) ответ на человеческое моноклональное антитело против MASP-2 (OMS646), измеренный в виде падения системной активности лектинового пути у мышей после подкожного введения, как описано в примере 40;

ФИГУРА 56 графически представляет ингибирующий эффект анти-MASP-2 антитела (OMS646) в сравнении с sCR1 на индуцированное aHUS сывороткой отложение C5b-9 на АДФ-активированных клетках HMEC-1, как описано в примере 41;

ФИГУРА 57 графически представляет ингибирующий эффект анти-MASP-2 антитела (OMS646) в сравнении с sCR1 на индуцированное aHUS сывороткой образование тромбов на АДФ-активированных клетках HMEC-1, как описано в примере 42;

ФИГУРА 58 графически представляет среднее изменение количества тромбоцитов от исходного значения в зависимости от времени (недели) у субъектов, страдающих от стойкой, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, тромботической микроангиопатии (HSCT-TMA), после лечения ингибирующим MASP-2 антителом (OMS646), как описано в примере 46;

ФИГУРА 59 графически представляет среднее изменение уровня LDH от исходного значения в зависимости от времени (недели) у субъектов, страдающих от стойкой HSCT-TMA, после лечения ингибирующим MASP-2 антителом (OMS646), как описано в примере 46;

ФИГУРА 60 графически представляет среднее изменение уровня гаптоглобина от исходного значения в зависимости от времени (недели) у субъектов, страдающих от стойкой HSCT-TMA, после лечения ингибирующим MASP-2 антителом (OMS646), как описано в примере 46;

ФИГУРА 61 показывает течение болезни у пациента после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT), у которого развилась HSCT-TMA и реакция трансплантат против хозяина (GVHD); наблюдается ослабление HSCT-TMA, GVHD и ослабление неврологических симптомов после лечения ингибирующим MASP-2 антителом (OMS646), как описано в примере 47;

ФИГУРА 62A графически представляет уровень креатинина в зависимости от времени при лечении из сострадания пациента № 1, где вертикальная линия отмечает начало лечения ингибирующим MASP-2 антителом (OMS646), как описано в примере 48;

ФИГУРА 62B графически представляет уровень гаптоглобина в зависимости от времени при лечении из сострадания пациента № 1, где вертикальная линия отмечает начало лечения ингибирующим MASP-2 антителом (OMS646), как описано в примере 48;

ФИГУРА 62C графически представляет уровень гемоглобина в зависимости от времени при лечении из сострадания пациента № 1, где вертикальная линия отмечает начало лечения ингибирующим MASP-2 антителом (OMS646), как описано в примере 48;

ФИГУРА 62D графически представляет уровень LDH в зависимости от времени при лечении из сострадания пациента № 1, где вертикальная линия отмечает начало лечения ингибирующим MASP-2 антителом (OMS646), как описано в примере 48; и

ФИГУРА 62E графически представляет уровень тромбоцитов в зависимости от времени при лечении из сострадания пациента № 1, где вертикальная линия отмечает начало лечения ингибирующим MASP-2 антителом (OMS646), как описано в примере 48.

ОПИСАНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 кДНК MAp19 человека

SEQ ID NO: 2 белок MAp19 человека (с лидером)

SEQ ID NO: 3 белок MAp19 человека (зрелый)

SEQ ID NO: 4 кДНК MASP-2 человека

SEQ ID NO: 5 белок MASP-2 человека (с лидером)

SEQ ID NO: 6 белок MASP-2 человека (зрелый)

SEQ ID NO: 7 гДНК MASP-2 человека (экзоны 1-6)

АНТИГЕНЫ: (ПРИМЕНИТЕЛЬНО К ЗРЕЛОМУ БЕЛКУ MASP-2)

SEQ ID NO: 8 последовательность CUBI (ак 1-121)

SEQ ID NO: 9 последовательность CUBEGF (ак 1-166)

SEQ ID NO: 10 CUBEGFCUBII (ак 1-293)

SEQ ID NO: 11 область EGF (ак 122-166)

SEQ ID NO: 12 домен сериновой протеазы (ак 429-671)

SEQ ID NO: 13 неактивный домен сериновой протеазы (ак 610-625 с мутацией Ser618 на Ala)

SEQ ID NO: 14 TPLGPKWPEPVFGRL (пептид CUB1)

SEQ ID NO: 15 TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQ (пептид CUBI)

SEQ ID NO: 16 TFRSDYSN (центр MBL-связывающей области)

SEQ ID NO: 17 FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF (MBL-связывающая область)

SEQ ID NO: 18 IDECQVAPG (пептид EGF)

SEQ ID NO: 19 ANMLCAGLESGGKDSCRGDSGGALV (центр связывания сериновой протеазы)

ПЕПТИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ:

SEQ ID NO: 20 полноразмерная кДНК MBL

SEQ ID NO: 21 полноразмерный белок MBL

SEQ ID NO: 22 OGK-X-GP (консенсусная последовательность связывания)

SEQ ID NO: 23 OGKLG

SEQ ID NO: 24 GLR GLQ GPO GKL GPO G

SEQ ID NO: 25 GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GPO GPO

SEQ ID NO: 26 GKDGRDGTKGEKGEPGQGLRGLQGPOGKLGPOG

SEQ ID NO: 27 GAOGSOGEKGAOGPQGPOGPOGKMGPKGEOGDO (h-фиколин человека)

SEQ ID NO: 28 GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPOGPOGKAGPOGPNGAOGEO (фиколин p35 человека)

SEQ ID NO: 29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI (сайт расщепления C4)

ИНГИБИТОРЫ ЭКСПРЕССИИ:

SEQ ID NO: 30 кДНК домена CUBI-EGF (нуклеотиды 22-680 в SEQ ID NO: 4)

SEQ ID NO: 31

5' CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC 3' Нуклеотиды 12-45 в SEQ ID NO: 4, включая сайт начала трансляции MASP-2 (смысловая)

SEQ ID NO: 32

5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3' Нуклеотиды 361-396 в SEQ ID NO: 4, кодирующие область, включающую сайт связывания MBL MASP-2 (смысловая)

SEQ ID NO: 33

5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAAA3' Нуклеотиды 610-642 в SEQ ID NO: 4, кодирующие область, включающую домен CUBII

ПРАЙМЕРЫ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ:

SEQ ID NO: 34 CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC (5' ПЦР для CUB)

SEQ ID NO: 35 GGAATTCCTAGGCTGCATA (3' ПЦР для CUB)

SEQ ID NO: 36 GGAATTCCTACAGGGCGCT (3' ПЦР для CUBIEGF)

SEQ ID NO: 37 GGAATTCCTAGTAGTGGAT (3' ПЦР для CUBIEGFCUBII)

SEQ ID NO: 38-47 представляют собой праймеры для клонирования гуманизированного антитела

SEQ ID NO: 48 представляет собой 9-ак связывающий пептид

ЭКСПРЕССИОННЫЙ ВЕКТОР:

SEQ ID NO: 49 представляет собой вставку минигена MASP-2

SEQ ID NO: 50 представляет собой кДНК MASP-2 мыши

SEQ ID NO: 51 представляет собой белок MASP-2 мыши (с/лидером)

SEQ ID NO: 52 представляет собой зрелый белок MASP-2 мыши

SEQ ID NO: 53 представляет собой кДНК MASP-2 крысы

SEQ ID NO: 54 представляет собой белок MASP-2 крысы (с/лидером)

SEQ ID NO: 55 представляет собой зрелый белок MASP-2 крысы

SEQ ID NO: 56-59 представляют собой олигонуклеотиды для сайт-направленного мутагенеза MASP-2 человека, использованные для получения MASP-2A человека

SEQ ID NO: 60-63 представляют собой олигонуклеотиды для сайт-направленного мутагенеза MASP-2 мыши, использованные для получения MASP-2A мыши

SEQ ID NO: 64-65 представляют собой олигонуклеотиды для сайт-направленного мутагенеза MASP-2 крысы, использованные для получения MASP-2A крысы

SEQ ID NO: 66 ДНК, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи (VH) (без сигнального пептида) 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646)

SEQ ID NO: 67 полипептид вариабельной области тяжелой цепи (VH) 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646)

SEQ ID NO: 68 полипептид вариабельной области тяжелой цепи (VH) 17N16mc

SEQ ID NO: 69: ДНК, кодирующая вариабельную область легкой цепи (VL) 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646)

SEQ ID NO: 70: полипептид вариабельной области легкой цепи (VL) 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646)

SEQ ID NO: 71: полипептид вариабельной области легкой цепи (VL) 17N16_dc17N9

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано на удивительном открытии авторов изобретения, заключающемся в том, что возможно ингибирование опосредованного MASP-2 лектинового пути с сохранением без изменения классического пути. Настоящее изобретение также относится к использованию MASP-2 в качестве терапевтической мишени для ингибирования повреждения клеток, связанного с опосредованным лектином путем активации комплемента, с сохранением без изменения компонента классического (C1q-зависимого) пути иммунной системы.

I. Определения

Если нет иных указаний, все термины, используемые в настоящем документе, имеют то значение, которое им обычно придают специалисты в области, к которой относится настоящее изобретение. Следующие определения приведены с целью обеспечения ясности в отношении терминов, используемых в описании и формуле изобретения для описания настоящего изобретения.

Используемый в настоящем документе термин «MASP-2-зависимая активация комплемента» означает MASP-2-зависимую активацию лектинового пути, которая происходит в физиологических условиях (то есть, в присутствии Ca^{++}), приводя к образованию C3-конвертазы C4b2a лектинового пути, и после накопления продукта расщепления C3, C3b, к последующему образованию C5-конвертазы C4b2a(C3b)n, которая была признана основной причиной опсонизации.

Используемый в настоящем документе термин «альтернативный путь» означает активацию комплемента, которая запускается, например, зимозаном из клеточной стенка грибков и дрожжей, липополисахаридом (LPS) из внешней мембраны грамотрицательных бактерий и кроличьими эритроцитами, а также многими чистыми полисахаридами, кроличьими эритроцитами, вирусами, бактериями, клетками опухолей животных, паразитами и поврежденными клетками, и которая, как принято считать, возникает в результате спонтанного протеолитического образования C3b из фактора комплемента C3.

Используемый в настоящем документе термин «лектиновый путь» означает активацию комплемента, которая происходит в результате специфического связывания

сывороточных и не сывороточных углевод-связывающих белков, включая маннан-связывающий лектин (MBL), CL-11 и фиколины (H-фиколин, M-фиколин или L-фиколин).

Используемый в настоящем документе термин «классический путь» означает активацию комплемента, которая запускается в результате связывания антитела с инородной частицей, и для которой необходимо связывание молекулы узнавания C1q.

Используемый в настоящем документе термин «ингибирующее MASP-2 средство» означает любое средство, которое связывается, или непосредственно взаимодействует, с MASP-2 и эффективно ингибирует MASP-2-зависимую активацию комплемента, включая анти-MASP-2 антитела и их MASP-2-связывающие фрагменты, природные и синтетические пептиды, малые молекулы, растворимые рецепторы MASP-2, ингибиторы экспрессии и выделенные природные ингибиторы, и также охватывает пептиды, которые конкурируют с MASP-2 за связывание с другой молекулой узнавания (такой как, например, MBL, H-фиколин, M-фиколин или L-фиколин) в лектиновом пути, но не охватывает антитела, которые связывают такие другие молекулы узнавания. Ингибирующие MASP-2 средства, полезные в способе по изобретению, могут уменьшать MASP-2-зависимую активацию комплемента на более чем 20%, например, на более чем 50%, например, на более чем 90%. В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 средство уменьшает MASP-2-зависимую активацию комплемента на более чем 90% (то есть, результатом является MASP-2-зависимая активация комплемента на уровне лишь 10% или менее).

Используемый в настоящем документе термин «антитело» охватывает антитела и фрагменты антител, полученные от любого продуцирующего антитела млекопитающего (например, мыши, крысы, кролика и примата, включая человека) или из гибридомы, в результате фаговой селекции, рекомбинантной экспрессии или от трансгенных животных (или с использованием других методов получения антител или фрагментов антител), которые специфически связывают полипептид-мишень, такой как, например, MASP-2, его полипептиды или части. Термин «антитело» не должен быть ограничен в отношении источника антитела или способа, которым оно получено (например, с использованием гибридомы, фаговой селекции, рекомбинантной экспрессии, трансгенного животного, пептидного синтеза и так далее). Иллюстративные антитела включают поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела; пан-специфические, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, триспецифические антитела); гуманизированные антитела; мышиные антитела; химерные, мышиные-человеческие, мышиные-приматные, приматные-человеческие моноклональные антитела; а также антиидиотипические антитела, и могут представлять собой любое интактное антитело, или его фрагмент. Используемый в настоящем документе термин «антитело» охватывает на только интактные поликлональные или моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как dAb, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv), одноцепочечные фрагменты (scFv), их синтетические варианты, природные варианты, слитые белки, содержащие часть антитела с антигенсвязывающим фрагментом нужной специфичности, гуманизированные антитела,

химерные антитела, а также любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий сайт или фрагмент (сайт узнавания эпитопа) нужной специфичности.

Термин «моноклональное антитело» означает гомогенную популяцию антител, при этом моноклональное антитело состоит из аминокислот (природных и неприродных), которые участвуют в избирательном связывании эпитопа. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными для антигена-мишени. Термин «моноклональное антитело» охватывает на только интактные моноклональные антитела и полноразмерные моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv), одноцепочечные фрагменты (scFv), их варианты, слитые белки, содержащие антигенсвязывающую часть, гуманизированные моноклональные антитела, химерные моноклональные антитела, а также любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий фрагмент (сайт узнавания эпитопа) нужной специфичности и имеет способность связывать эпитоп. Термин не должен быть ограничен в отношении источника антитела или способа, которым оно получено (например, с использованием гибридомы, фаговой селекции, рекомбинантной экспрессии, трансгенных животных и так далее). Термин охватывает целые иммуноглобулины, а также фрагменты, и так далее, описанные выше при разъяснении термина «антитело».

Используемый в настоящем документе термин «фрагмент антитела» означает часть, полученную из, или производную от, полноразмерного антитела, такого как, например, анти-MASP-2 антитело, как правило, включающую его антигенсвязывающую или вариабельную область. Иллюстративные примеры фрагментов антитела включают фрагменты Fab, Fab', $F(ab)_2$, $F(ab')_2$ и Fv, фрагменты scFv, диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител, а также мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Используемый в настоящем документе термин «одноцепочечный Fv», или «scFv», фрагмент антитела содержит домены VH и VL антитела, причем эти домены расположены на одной полипептидной цепи. Как правило, полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет scFv формировать нужную структуру для связывания антигена.

Используемый в настоящем документе термин «химерное антитело» означает рекомбинантный белок, который содержит вариабельные домены и определяющие комплементарность области из антител видов, отличных от человека (например, грызунов), в то время как остальная часть молекулы антитела происходит из человеческого антитела.

Используемый в настоящем документе термин «гуманизированное антитело» означает химерное антитело, которое содержит минимальную последовательность, соответствующую определяющим специфичность областям, не принадлежащего человеку иммуноглобулина, которая вставлена в каркас человеческого антитела.

Гуманизированные антитела, как правило, представляют собой рекомбинантные белки, в которых только определяющие комплементарность области антитела происходят не из антитела человека.

Используемый в настоящем документе термин «маннан-связывающий лектин» («MBL») эквивалентен термину «маннан-связывающий белок» («MBP»).

Используемый в настоящем документе термин «мембраноатакующий комплекс» («MAC») означает комплекс из пяти терминальных компонентов комплемента (C5b в сочетании с C6, C7, C8 и C-9), который встраивается в, и разрушает, мембраны (иное название C5b-9).

Используемый в настоящем документе термин «субъект» включает всех млекопитающих, в том числе, без ограничения, людей, приматов, собак, кошек, лошадей, овец, коз, коров, кроликов, свиней и грызунов.

При использовании в настоящем документе аминокислотные остатки имеют следующие сокращения: аланин (Ala; A), аспарагин (Asn; N), аспарагиновая кислота (Asp; D), аргинин (Arg; R), цистеин (Cys; C), глутаминовая кислота (Glu; E), глутамин (Gln; Q), глицин (Gly; G), гистидин (His; H), изолейцин (Ile; I), лейцин (Leu; L), лизин (Lys; K), метионин (Met; M), фенилаланин (Phe; F), пролин (Pro; P), серин (Ser; S), треонин (Thr; T), триптофан (Trp; W), тирозин (Tyr; Y) и валин (Val; V).

В самом широком смысле природные аминокислоты можно разделять на группы на основании химических характеристик боковых цепей соответствующих аминокислот. К «гидрофобным» аминокислотам относятся Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys или Pro. К «гидрофильным» аминокислотам относятся Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg или His. Эта группа аминокислот может быть дополнительно разделена на подклассы следующим образом. К «незаряженным гидрофильным» аминокислотам относятся Ser, Thr, Asn или Gln. К «кислым» аминокислотам относятся Glu или Asp. К «основным» аминокислотам относятся Lys, Arg или His.

Используемый в настоящем документе термин «консервативная аминокислотная замена» означает взаимную замену аминокислот внутри каждой из следующих групп: (1) глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин, (2) фенилаланин, тирозин и триптофан, (3) серин и треонин, (4) аспартат и глутамат, (5) глутамин и аспарагин, и (6) лизин, аргинин и гистидин.

Используемый в настоящем документе термин «олигонуклеотид» означает олигомер или полимер рибонуклеиновой кислоты (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), или их миметики. Этот термин также охватывает олигонуклеотиды, состоящие из природных нуклеотидов, остатков сахара и ковалентных межнуклеозидных (каркасных) связей, а также олигонуклеотиды, имеющие неприродные модификации.

Используемый в настоящем документе термин «эпитоп» означает сайт на белке (например, человеческом белке MASP-2), который связывает антитело. «Перекрывающиеся эпитопы» включают по меньшей мере один (например, два, три, четыре, пять или шесть) общих аминокислотных остатков, включая линейные и

нелинейные эпитопы.

В настоящем документе термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и означают любую связанную пептидными связями цепь аминокислот, независимо от длины или пост-трансляционной модификации. Белок MASP-2, описанный в настоящем документе, может содержать, или представлять собой, белок дикого типа, или может представлять собой варианты, которые могут иметь 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, как правило, включают замены внутри 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.

В некоторых вариантах осуществления человеческий белок MASP-2 может иметь аминокислотную последовательность, которая на, или более чем на, 70 (например, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, или 100) % идентична человеческому белку MASP-2, имеющему аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления пептидные фрагменты могут иметь длину по меньшей мере 6 (например, по меньшей мере 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, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или 600, или более) аминокислотных остатков (например, по меньшей мере 6 последовательных аминокислотных остатков в SEQ ID NO: 5). В некоторых вариантах осуществления антигенный пептидный фрагмент человеческого белка MASP-2 имеет длину менее 500 (например, менее 450, 400, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7 или 6) аминокислотных остатков (например, менее 500 последовательных аминокислотных остатков в SEQ ID NO: 5).

Процент (%) идентичности аминокислотных последовательностей определяют как процентную долю аминокислот в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотам в эталонной последовательности после выравнивания последовательностей и внесения делеций, при необходимости, для достижения максимального процента идентичности последовательностей. Выравнивание для целей определения процента идентичности последовательностей можно выполнять различными методами, которые известны специалистам в данной области, например, с использованием общедоступных компьютерных программ, таких как программы BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR). Соответствующие параметры для определения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимально оптимального выравнивания по все длине сравниваемой

последовательности, можно определять известными способами.

II. Сущность изобретения

Лектины (MBL, M-фиколин, H-фиколин, L-фиколин и CL-11) представляют собой специфические молекулы узнавания, которые запускают врожденную систему комплемента, и система включает лектиновый путь инициации и связанный цикл амплификации терминального пути, который усиливает инициированную лектинами активацию терминальных эффекторных молекул комплемента. C1q представляет собой специфическую молекулу узнавания, которая запускает приобретенную систему комплемента, и система включает классический путь инициации и связанный цикл амплификации терминального пути, который усиливает инициированную C1q активацию терминальных эффекторных молекул комплемента. Авторы изобретения называют эти две основные системы активации комплемента лектин-зависимой системой комплемента и C1q-зависимой системой комплемента, соответственно.

Помимо ее важной роли в иммунной защите, система комплемента способствует повреждению тканей при многих клинических состояниях. Таким образом, существует острая потребность в разработке терапевтически эффективных ингибиторов комплемента для предотвращения этих неблагоприятных эффектов. С признанием возможности ингибирования опосредованного MASP-2 лектинового пути, не затрагивая при этом классический путь, приходит понимание того, что было бы крайне желательно специфически ингибировать лишь систему активации комплемента, вызывающую конкретную патологию, без полного отключения способности комплемента к иммунной защите. Например, при болезненных состояниях, в которых активация комплемента опосредуется преимущественно лектин-зависимой системой комплемента, было бы полезно специфически ингибировать только эту систему. Это позволило бы сохранять C1q-зависимую систему активации комплемента интактной для возможности процессинга иммунных комплексов и участия в защите хозяина от инфекции.

Предпочтительным белковым компонентом-мишенью при разработке лекарственных средств для специфического ингибирования лектин-зависимой системы комплемента является MASP-2. Из всех известных белковых компонентов лектин-зависимой системы комплемента (MBL, H-фиколин, M-фиколин, L-фиколин, MASP-2, C2-C9, фактор B, фактор D и пропердин) лишь MASP-2 является уникальным для лектин-зависимой системы комплемента и необходимым для функционирования этой системы. Лектины (MBL, H-фиколин, M-фиколин, L-фиколин и CL-11) также являются уникальными компонентами в лектин-зависимой системе комплемента. Однако утрата любого из этих лектиновых компонентов не обязательно приводит к ингибированию активации системы вследствие лектиновой избыточности. Было бы необходимо ингибировать все пять лектинов для гарантированного ингибирования лектин-зависимой системы активации комплемента. Кроме того, поскольку MBL и фиколины, как известно, также обладают опсонической активностью, независимой от комплемента, ингибирование функции лектинов привело бы к утрате этого полезного механизма защиты хозяина от

инфекции. Напротив, эта независимая от комплемента опсоническая активность лектинов осталась бы незатронутой, если бы мишенью ингибирования был белок MASP-2. Дополнительным преимуществом MASP-2 в качестве терапевтической мишени для ингибирования лектин-зависимой системы активации комплемента является то, что концентрация в плазме MASP-2 является одной из самых низких для белков комплемента (≈ 500 нг/мл); таким образом, соответственно низкие концентрации высокоаффинных ингибиторов MASP-2 могут быть достаточными для достижения полного ингибирования (Moller-Kristensen, M., et al., J. Immunol *Способы* 282:159-167, 2003).

III. Роль MASP-2 в тромботических микроангиопатиях и способы лечения с использованием ингибирующих MASP-2 средств

Обзор

Тромботическая микроангиопатия (TMA) представляет собой патологию, характеризующуюся образованием кровяных сгустков в мелких кровеносных сосудах (Benz, K.; et al., Curr Opin Nephrol Hypertens 19(3):242-7 (2010)). Основной причиной считают стресс или повреждение подлежащего эндотелия сосудов. Клинические и лабораторные показатели TMA включают тромбоцитопению, анемию, пурпуру и почечную недостаточность. Классическими TMA являются гемолитический уремический синдром (HUS) и тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (TTP). Характерным основополагающим патологическим признаком TMA являются активация тромбоцитов и образование микротромбов в мелких артериолах и венулах. Активация комплемента, инициируемая, по меньшей мере частично, повреждением или стрессом эндотелия микрососудов, также вовлечена в другие TMA, включая катастрофический антифосфолипидный синдром (CAPS), системную болезнь Дегоса, а также TMA вследствие рака, противораковой химиотерапии и трансплантации.

Прямое доказательство патологической роли комплемента в различных формах нефрита получено при изучении пациентов с генетическим дефицитом определенных компонентов комплемента. В ряде работ установлена связь повреждения почек с дефицитом регуляторного фактора H комплемента (Ault, B.H., Nephrol. 14:1045-1053, 2000; Levy, M., et al., Kidney Int. 30:949-56, 1986; Pickering, M.C., et al., Nat. Genet. 31:424-8, 2002). Дефицит фактора H приводит к низким уровням в плазме фактора B и C3 вследствие связанного с активацией поглощения этих компонентов. Циркулирующие уровни C5b-9 также повышены в сыворотке таких пациентов, что предполагает активацию комплемента. Мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит (MPGN) и идиопатический гемолитический уремический синдром (HUS) связаны с дефицитом фактора H или мутациями фактора H. Свиньи с дефицитом фактора H (Jansen, J.H., et al., Kidney Int. 53:331-49, 1998) и мыши с нокаутом фактора H (Pickering, M.C., 2002) проявляют MPGN-подобные симптомы, что подтверждает важность фактора H в регуляции комплемента. Дефициты других компонентов комплемента связаны с почечной недостаточностью, возникающей вследствие системной красной волчанки (SLE) (Walport, M.J., Davies, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 815:267-81, 1997). Дефицит C1q, C4 и C2 является

сильным фактором предрасположенности к развитию SLE по механизмам, связанным с нарушением клиренса иммунных комплексов и апоптотического материала. У многих из этих пациентов с SLE развивается волчаночный нефрит, характеризующийся отложением иммунных комплексов во всей клубочковой зоне.

aHUS

Атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS) относится к группе состояний, называемых «тромботическими микроангиопатиями». В случае атипичной формы HUS (aHUS) заболевание связано с нарушенной регуляцией комплемента, и может быть или спорадическим, или семейным. Семейные случаи aHUS связаны с мутациями в генах, кодирующих белки, ответственные за активацию комплемента или регуляцию комплемента, включая фактор H, фактор I, фактор B комплемента, мембранный кофактор CD46, а также связанный с фактором H комплемента белок 1 (CFHR1) и связанный с фактором H комплемента белок 3 (CFHR3). (Zipfel, P.F., et al., PloS Genetics 3(3):e41 (2007)). Объединяющей чертой этого разнообразного набора генетических мутаций, связанных с aHUS, является предрасположенность к повышенной активации комплемента на клеточных или тканевых поверхностях. Таким образом, один аспект настоящего изобретения относится к лечению пациента, страдающего от aHUS, связанного с дефицитом фактора H, путем введения эффективного количества ингибирующего MASP-2 средства. Другой аспект настоящего изобретения относится к лечению пациента, страдающего от HUS, связанного с дефицитом фактора I, фактора B, мембранного кофактора CD46, CFHR1 или CFHR3, путем введения эффективного количества ингибирующего MASP-2 средства.

В последнее время достигнут значительный прогресс в понимании молекулярной патофизиологии, лежащей в основе повышенной активации комплемента при aHUS, вызываемой различным набором мутантных факторов комплемента. Лучше всего изучен механизм для мутаций фактора H. Фактор H является присутствующим в изобилии в сыворотке белком, содержащим 20 доменов коротких консенсусных повторов (SCR), который действует в качестве отрицательного регулятора активации комплемента как в растворе, так и на поверхности клетки-хозяина. Он направлен на активированную форму C3, и, совместно с фактором I и другими кофакторами, стимулирует его инактивацию, препятствуя дальнейшей активации комплемента. Для эффективного контроля активации комплемента на поверхности клетки-хозяина фактор H должен взаимодействовать с клетками-хозяевами, что опосредуется доменами 16-20 SCR. Все связанные с aHUS мутации фактора H, описанные до настоящего времени, сконцентрированы в C-концевой области, охватывающей домены 16-20 (SCR). Эти мутантные белки фактора H являются полностью функциональными для контроля активации C3 в растворе, но неспособны к взаимодействию с поверхностью клетки-хозяина и, следовательно, неспособны контролировать активацию C3 на клеточных поверхностях (Exp Med 204(6):1249-56 (2007)). Таким образом, некоторые мутации фактора H связаны с aHUS, поскольку мутантный белок фактора H неспособен взаимодействовать с поверхностями клеток-

хозяев и, следовательно, неспособен к эффективной понижающей регуляции активации комплемента на поверхностях клеток-хозяев, включая микроваскулярный эндотелий. В результате после начальной активации C3 последующая активация комплемента на поверхности микроваскулярного эндотелия не ослабевает у пациентов с мутациями фактора H. Такая неконтролируемая активация комплемента в конце концов приводит к прогрессирующему повреждению сосудистого эндотелия, последующей агрегации тромбоцитов и микрососудистой коагуляции, а также гемолизу, вызываемому силой сдвига при прохождении эритроцитов через частично перекрытые микрососуды. Таким образом, проявления заболевания aHUS, а также клинические и лабораторные показатели напрямую связаны с нарушением отрицательной регуляции комплемента на поверхности микроваскулярного эндотелия.

Аналогично мутации фактора H, мутации с потерей функции в отрицательных модуляторах комплемента, факторе I и мембранном кофакторе (CD46), также связаны с aHUS. Обратная ситуация была обнаружена для белков фактора B и C3, в этом случае aHUS, как установлено, связан с мутациями приобретения функции в этих белках (Pediatr Nephrol 25(12):2431-42 (2010)). Таким образом, совокупность данных указывает на участие активации комплемента в патогенезе aHUS. Этот вывод наиболее убедительно подтверждает терапевтическая эффективность экулизумаба, моноклонального антитела, блокирующего терминальный белок C5 комплемента, в лечении aHUS.

При том, что центральная роль комплемента в качестве эффекторного механизма в aHUS широко признана, триггеры, инициирующие активацию комплемента, и вовлеченные молекулярные пути не определены. Не у всех людей, имеющих описанные выше мутации, развивается aHUS. Фактически, семейные исследования показали, что пенетрантность aHUS составляет всего ~50%. (Ann Hum Genet 74(1):17-26 (2010)). Естественная динамика заболевания указывает на то, что aHUS наиболее часто развивается после начального события, такого как инфекционное заболевание или повреждение. Хорошо известно, что возбудители инфекции активируют систему комплемента. В отсутствие ранее существовавшего адаптивного иммунитета активация комплемента возбудителями инфекции может преимущественно инициироваться через лектиновый путь. Таким образом, активация лектинового пути, запускаемая инфекцией, может представлять собой начальный триггер для последующего патологического усиления активации комплемента у предрасположенных к aHUS индивидуумов, что в итоге может приводить к прогрессированию заболевания. Соответственно, другой аспект настоящего изобретения относится к лечению пациента, страдающего от aHUS, связанного с инфекцией, путем введения эффективного количества ингибирующего MASP-2 средства.

Другие виды повреждения тканей хозяина также будут активировать комплемент через лектиновый путь, в частности, повреждение сосудистого эндотелия. Эндотелиальные клетки сосудов человека, подвергнутые окислительному стрессу, например, отвечают экспрессией поверхностных молекул, связывающих лектины и

активирующих лектиновый путь комплемента (Am J. Pathol 156(6):1549-56 (2000)). Повреждение сосудов после ишемии/реперфузии также приводит к активации комплемента через лектиновый путь in vivo (Scand J Immunol 61(5):426-34 (2005)). Активация лектинового пути в этих условиях имеет патологические последствия для хозяина, и ингибирование лектинового пути за счет блокирования MASP-2 предотвращает дальнейшее повреждение тканей хозяина и неблагоприятные исходы (Schwaeble PNAS 2011).

Таким образом, известно, что и другие процессы, провоцирующие aHUS, также активируют лектиновый путь комплемента. Вследствие этого, вероятно, что лектиновый путь может представлять собой исходный механизм активации комплемента, который неадекватно усиливается нерегулируемым образом у людей, генетически предрасположенных к aHUS, таким образом, инициируя патогенез aHUS. Можно сделать вывод, что средства, которые блокируют активацию комплемента через лектиновый путь, включая анти-MASP-2 антитела, предположительно будут предотвращать прогрессирование заболевания или уменьшать обострения у предрасположенных к aHUS индивидуумов.

В поддержку данной концепции, в недавних исследованиях была идентифицирована S. pneumonia в качестве важного этиологического агента в случаях aHUS у детей. (Nephrology (Carlton), 17:48-52 (2012); Pediatr Infect Dis J. 30(9):736-9 (2011)). Эта конкретная этиология, судя по всему, имеет неблагоприятный прогноз со значительной смертностью и длительным тяжелым состоянием. Примечательно, что эти случаи включали не энтеральную инфекцию, приводящую к проявлениям микроангиопатии, уремии и гемолиза без признаков сопутствующих мутаций в генах комплемента, о которых известно, что они отвечают за предрасположенность к aHUS. Важно отметить, что S. pneumonia особенно эффективна в активации комплемента, и осуществляет это преимущественно через лектиновый путь. Таким образом, в случаях не энтерального HUS, связанного с пневмококковой инфекцией, проявления микроангиопатии, уремии и гемолиза предположительно обусловлены активацией лектинового пути, и ожидается, что средства, блокирующие лектиновый путь, включая анти-MASP-2 антитела, будут предотвращать прогрессирование aHUS или уменьшать степень тяжести заболевания у этих пациентов. Соответственно, другой аспект настоящего изобретения относится к лечению пациента, страдающего от не энтерального aHUS, связанного с инфекцией, вызываемой S. pneumonia, путем введения эффективного количества ингибирующего MASP-2 средства.

В соответствии с вышеизложенным, в некоторых вариантах осуществления в случае субъекта, имеющего риск развития почечной недостаточности, связанной с aHUS, предложен способ уменьшения вероятности развития aHUS или развития почечной недостаточности, связанной с aHUS, включающий введение ингибирующего MASP-2 средства в определенном количестве в течение периода времени, эффективного для облегчения или предотвращения почечной недостаточности у субъекта. В некоторых

вариантах осуществления способ дополнительно включает этап определения того, имеет ли субъект риск развития aHUS, до начала проявления каких-либо симптомов, связанных с aHUS. В других вариантах осуществления способ включает определение того, имеет ли субъект риск развития aHUS, после начала проявления по меньшей мере одного или более симптомов, характерных для aHUS (например, наличия анемии, тромбоцитопении и/или почечной недостаточности), и/или наличия признаков тромботической микроангиопатии в биопсийных образцах, полученных от субъекта. Определение того, имеет ли субъект риск развития aHUS, включает определение того, имеет ли субъект генетическую предрасположенность к развитию aHUS, что можно осуществлять путем оценки генетической информации (например, в базе данных о генотипе субъекта), или путем проведения по меньшей мере одного генетического теста для субъекта с целью определения наличия или отсутствия генетического маркера, связанного с aHUS (то есть, определения наличия или отсутствия генетической мутации, связанной с aHUS, в генах, кодирующих фактор H (CFH), фактор I (CFI), фактор B (CFB) комплемента, мембранный кофактор CD46, C3, связанный с фактором H комплемента белок 1 (CFHR1), или THBD (антикоагулянтный белок тромбомодулин), или связанный с фактором H комплемента белок 3 (CFHR3), связанный с фактором H комплемента белок 4 (CFHR4)), либо путем секвенирования генома, либо с использованием специфического для генов анализа (например, ПЦР-анализа), и/или путем определения того, имеет ли субъект в семейном анамнезе aHUS. Методы генетического скрининга на наличие или отсутствие генетической мутации, связанной с aHUS, хорошо известны, например, смотри Noris M et al. «Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome», 2007 Nov 16 [доработано 2011 Mar 10] в: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™, Seattle (WA): University of Washington, Seattle.

Например, общая пенетрантность заболевания у субъектов с мутациями фактора H комплемента (CFH) составляет 48%, и пенетрантность для мутаций в CD46 составляет 53%, для мутаций в CFI составляет 50%, для мутаций в C3 составляет 56% и для мутаций в THBD составляет 64% (Caprioli J. et al., Blood, 108:1267-79 (2006); Noris et al., Clin J Am Soc Nephrol 5:1844-59 (2010)). Как описано в публикации Caprioli et al., (2006), выше, у значительного числа индивидуумов с мутацией в факторе H комплемента (CFH) никогда не развивается aHUS, и постулировано, что субоптимальная активность CFH у этих индивидуумов является достаточной для защиты хозяина от эффектов активации комплемента в физиологических условиях, однако субоптимальная активность CFH является недостаточной для предотвращения отложения C3b на эндотелиальных клетках сосудов, когда воздействие средства, активирующего комплемент, приводит к образованию количеств C3b, превышающих нормальные.

Соответственно, в одном варианте осуществления предложен способ ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента у субъекта, страдающего от, или имеющего риск развития, не зависимого от фактора H атипичного гемолитического уремического синдрома, включающий введение субъекту композиции, содержащей

ингибирующее MASP-2 средство, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В другом варианте осуществления предложен способ ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента у субъекта, имеющего риск развития зависимого от фактора H атипичного гемолитического уремического синдрома, включающий периодический мониторинг субъекта для определения наличия или отсутствия анемии, тромбоцитопении или повышенного уровня креатинина, и лечение ингибирующим MASP-2 средством при определении наличия анемии, тромбоцитопении или повышенного уровня креатинина. В другом варианте осуществления предложен способ уменьшения вероятности того, что субъект, имеющий риск развития зависимого от фактора H aHUS, будет страдать от клинических симптомов, связанных с aHUS, включающий введение ингибирующего MASP-2 средства до, или в процессе, или после события, которое, как известно, связано с инициированием клинических симптомов aHUS, например, воздействия лекарственного средства (например, химиотерапии), инфекции (например, бактериальной инфекции), злокачественного новообразования, травмы, трансплантации органа или ткани, или беременности.

В одном варианте осуществления предложен способ уменьшения вероятности того, что субъект, имеющий риск развития aHUS, будет страдать от клинических симптомов, связанных с aHUS, включающий периодический мониторинг субъекта для определения наличия или отсутствия анемии, тромбоцитопении или повышенного уровня креатинина, и лечение ингибирующим MASP-2 средством при определении наличия анемии, тромбоцитопении или повышенного уровня креатинина.

В другом варианте осуществления предложен способ уменьшения вероятности того, что субъект, имеющий риск развития aHUS, будет страдать от клинических симптомов, связанных с aHUS, включающий введение ингибирующего MASP-2 средства до, или в процессе, или после события, которое, как известно, связано с инициированием клинических симптомов aHUS, например, воздействия лекарственного средства (например, химиотерапии), инфекции (например, бактериальной инфекции), злокачественного новообразования, травмы, трансплантации органа или ткани, или беременности.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 средство вводят в течение периода времени, составляющего по меньшей мере один, два, три, четыре дня, или дольше, до, в процессе, или после события, связанного с инициированием клинических симптомов aHUS, и введение можно повторять в соответствии с решением врача до того момента, когда состояние будет устранено или взято под контроль. В условиях пре-aHUS ингибирующее MASP-2 средство можно вводить субъекту системно, например, внутриартериальным, внутривенным, внутримышечным, ингаляционным, назальным, подкожным или другим парентеральным путем введения.

В некоторых вариантах осуществления в случае первичного диагностирования aHUS, или в случае субъекта, имеющего один или более симптомов, согласующихся с

диагнозом aHUS (например, анемии, тромбоцитопении и/или почечной недостаточности), субъекта лечат эффективным количеством ингибирующего MASP-2 средства (например, анти-MASP-2 антитела) в качестве терапии первой линии, без плазмафереза или в сочетании с плазмаферезом. В качестве первой линии терапии ингибирующее MASP-2 средство можно вводить субъекту системно, например, внутриартериальным, внутривенным, внутримышечным, ингаляционным, назальным, подкожным или другим парентеральным путем введения. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 средство вводят субъекту в качестве терапии первой линии без плазмафереза во избежание потенциальных осложнений плазмафереза, включающих кровотечение, инфицирование и воздействие болезнетворных и/или аллергических факторов, присутствующих в плазме донора, или в случае субъекта, отвергающего плазмаферез, или в условиях, когда плазмаферез недоступен.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ингибирующего MASP-2 средства субъекту, страдающему от aHUS, через катетер (например, внутривенно) в течение первого периода времени (например, по меньшей мере одного дня или недели, или двух недель), с последующим введением ингибирующего MASP-2 средства субъекту подкожно в течение второго периода времени (например, хронической фазы протяженностью по меньшей мере две недели или дольше). В некоторых вариантах осуществления введение в первый и/или второй период времени выполняют без плазмафереза. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня по меньшей мере одного фактора комплемента (например, C3, C5) у субъекта до начала лечения и, необязательно, в процессе лечения, при этом определение сниженного уровня по меньшей мере одного фактора комплемента в сравнении со стандартным значением, или значением у здорового контрольного субъекта, указывает на необходимость продолжения лечения ингибирующим MASP-2 средством.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ингибирующего MASP-2 средства, такого как анти-MASP-2 антитело, субъекту, страдающему от, или имеющему риск развития, aHUS, внутривенно, внутримышечно или, предпочтительно, подкожно. Лечение может быть хроническим и применяться ежедневно или ежемесячно, но, предпочтительно, каждые две недели. Анти-MASP-2 антитело можно вводить отдельно или в сочетании с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

HUS

Подобно атипичному HUS, типичная форма HUS имеет все клинические и лабораторные признаки TMA. Однако типичный HUS часто является детским заболеванием и, как правило, не имеет семейного компонента или прямой связи с мутациями в генах факторов комплемента. Этиология типичного HUS тесно связана с инфекцией, вызываемой определенными кишечными патогенами. Пациенты, как правило, имеют острую почечную недостаточность, гемоглобинурию и тромбоцитопению, которая, как правило, следует за приступом кровавой диареи. Это состояние является следствием кишечной инфекции, вызываемой Shigella dissenteria, Salmonella или продуцирующими

токсин, подобный шига-токсину, энтерогеморрагическими штаммами E. coli, такими как such as E. coli O157:H7. Патогены поступают в организм из загрязненных источников пищи или воды. HUS требует неотложной медицинской помощи, и в 5-10% случаев приводит к смерти. У значительной части выживших развивается хроническая почечная недостаточность (Corrigan and Boineau, Pediatr Rev 22 (11): 365-9 (2011)), и они могут нуждаться в трансплантации почки.

Микроваскулярная коагуляция при типичном HUS происходит преимущественно, но не исключительно, в микрососудистом русле почки. Основные патофизиологические признаки опосредуются шига-токсином (STX). Выделяемый энтеропатическими микробами в просвет кишечника STX проникает через кишечный барьер, попадает в кровоток и связывается с эндотелиальными клетками сосудов через блоботриаозил-церамидный рецептор CD77 (Boyd and Lingwood Nephron 51:207 (1989)), который преимущественно экспрессируется на эндотелии клубочков и опосредует токсический эффект STX. После связывания с эндотелием STX индуцирует серию событий, которые повреждают эндотелий сосудов, активируют лейкоциты и вызывают vWF-зависимое образование тромбов (Forsyth et al., Lancet 2: 411-414 (1989); Zoja et al., Kidney Int. 62: 846-856 (2002); Zanchi et al., J. Immunol. 181:1460-1469 (2008); Morigi et al., Blood 98: 1828-1835 (2001); Guessou et al., Infect. Immun., 73: 8306-8316 (2005)). Эти микротромбы закупоривают или перекрывают артериолы и капилляры почки и других органов. Обструкция кровотока в артериолах и капиллярах микротромбами увеличивает силу сдвига, действующую на эритроциты при их продвижении через суженные кровеносные сосуды. Это может приводить к разрушению эритроцитов за счет силы сдвига и образованию фрагментов эритроцитов, называемых шизоцитами. Наличие шизоцитов является характерным признаком HUS. Данный механизм известен как микроангиопатический гемолиз. Кроме того, обструкция кровотока приводит к ишемии, инициируя опосредуемый комплементом воспалительный ответ, вызывающий дополнительное повреждение пораженного органа.

Лектинововый путь комплемента участвует в патогенезе HUS за счет двух основных механизмов: 1) MASP-2-опосредованной прямой активации каскада коагуляции, вызываемой повреждением эндотелия, и 2) последующей лектин-опосредованной активации комплемента, индуцируемой ишемией, возникающей вследствие начальной окклюзии микрососудистого кровотока.

STX повреждает микроваскулярные эндотелиальные клетки, и поврежденные эндотелиальные клетки, как известно, активируют систему комплемента. Как подробно описано выше, активация комплемента после повреждения эндотелиальных клеток осуществляется преимущественно через лектиновый путь. Человеческие эндотелиальные клетки сосудов, подвергнутые окислительному стрессу, отвечают экспрессией поверхностных молекул, связывающих лектины и активирующих лектиновый путь комплемента (Collard et al., Am J Pathol. 156(5):1549-56 (2000)). Повреждение сосудов после ишемии/реперфузии также приводит к активации комплемента через лектиновый

путь in vivo (Scand J Immunol 61(5):426-34 (2005)). Активация лектинового пути в этих условиях имеет патологические последствия для хозяина, и ингибирование лектинового пути за счет блокирования MASP-2 предотвращает дальнейшее повреждение тканей хозяина и неблагоприятные исходы (Schwaeble PNAS 2011). Помимо активации комплемента, лектин-зависимая активация MASP-2, как показано, приводит к расщеплению протромбина, с образованием тромбина, и стимулирует коагуляцию. Таким образом, активация лектинового пути комплемента поврежденными эндотелиальными клетками может напрямую активировать систему коагуляции. Лектиновый путь комплемента, за счет MASP-2-опосредуемой активации протромбина, таким образом, вероятно, является основным молекулярным путем, связывающим первичное повреждение STX эндотелия с коагуляцией и микрососудистым тромбозом, который происходит при HUS. Вследствие этого ожидается, что ингибиторы лектинового пути, включая, но без ограничения, антитела, блокирующие функцию MASP-2, будут предотвращать или уменьшать микрососудистую коагуляцию, тромбоз и гемолиз у пациентов, страдающих от HUS. Действительно, введение анти-MASP-2 антитела эффективно защищает мышей в модели типичного HUS. Как описано в примере 36 и показано на ФИГУРЕ 45, у всех контрольных мышей, подвергнутых воздействию STX и LPS, развивался тяжелый HUS, они находились в предсмертном состоянии или погибали в течение 48 часов. С другой стороны, как дополнительно показано на ФИГУРЕ 45, все мыши, получавшие анти-MASP-2 антитело, а затем подвергнутые воздействию STX и LPS, выживали (точный критерий Фишера $p<0,01$; $N=5$). Таким образом, анти-MASP-2 терапия эффективно защищает мышей в данной модели HUS. Ожидается, что введение ингибирующего MASP-2 средства, такого как анти-MASP-2 антитело, будет эффективно для лечения пациентов с HUS и обеспечит защиту от микрососудистой коагуляции, тромбоза и гемолиза в результате инфекции, вызываемой энтеропатической E. coli или другими STX-продуцирующими патогенами.

Хотя в настоящем документе это продемонстрировано для HUS, вызываемого STX, ожидается, что анти-MASP-2 терапия также будет полезной при HUS-подобных синдромах вследствие повреждения эндотелия, вызываемого другими токсическими средствами. К ним относятся такие средства, как митомицин, тиклопидин, цисплатин, хинин, циклоспорин, блеомицин, а также другие химиотерапевтические лекарственные средства и иммунодепрессанты. Таким образом, ожидается, что терапия анти-MASP-2 антителом, или другими средствами, которые ингибируют активность MASP-2, будет эффективно предотвращать или ограничивать коагуляцию, образование тромбов и разрушение эритроцитов, а также предотвращать почечную недостаточность при HUS и других связанных заболеваниях TMA (то есть, aHUS и TTP).

У пациентов, страдающих от HUS, часто наблюдается диарея и рвота, у них, как правило, снижено количество тромбоцитов (тромбоцитопения) и снижено количество эритроцитов (анемия). Пре-HUS фаза диареи, как правило, продолжается в течение примерно четырех дней, в этот период субъекты, имеющие риск развития HUS, как

правило, имеют одни или более из следующих симптомов, помимо тяжелой диареи: уровень гематокрита ниже 30% с признаками внутрисосудистого разрушения эритроцитов в мазке крови, тромбоцитопения (количество тромбоцитов $<150\times10^3$/мм^3), и/или нарушение почечной функции (сывороточная концентрация креатинина выше верхнего предела эталонного диапазона для возраста). Наличие олигурии (диурез ≤0,5 мл/кг/ч в течение >1 дня) может быть использовано в качестве меры прогрессирования в сторону развития HUS (смотри C. Hickey et al., Arch Pediatr Adolesc Med 165(10):884-889 (2011)). Как правило, проводят тестирование на наличие инфекции, вызываемой бактериями E. coli (E. coli O157:H7), либо видами Shigella или Salmonella. Для субъектов с положительными результатами теста на инфекцию, вызываемую энтерогенной E. coli (например, E. coli 0157:H7), использование антибиотиков противопоказано, поскольку использование антибиотиков может повышать риск развития HUS за счет повышенного продуцирования STX (Смотри Wong C. et al., N Engl J. Med 342:1930-1936 (2000). Субъектам с положительными результатами теста на инфекцию, вызываемую Shigella или Salmonella, как правило, вводят антибиотики для устранения инфекции. Другая широко используемая терапия первой линии против HUS включает увеличение объема крови, диализ и плазмаферез.

В соответствии с вышеизложенным, в некоторых вариантах осуществления в случае субъекта, страдающего от одного или более симптомов, связанных с фазой пре-HUS, и имеющего риск развития HUS (то есть, субъекта, имеющего одно или более из следующего: диарея, уровень гематокрита ниже 30% с признаками внутрисосудистого разрушения эритроцитов в мазке крови, тромбоцитопения (количество тромбоцитов $<150\times10^3$/мм^3) и/или нарушение почечной функции (сывороточная концентрация креатинина выше верхнего предела эталонного диапазона для возраста)), предложен способ уменьшения риска развития HUS, или уменьшения вероятности развития почечной недостаточности у субъекта, включающий введение ингибирующего MASP-2 средства в определенном количестве в течение периода времени, эффективного для облегчения или предотвращения почечной недостаточности. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 средство вводят в течение периода времени, составляющего по меньшей мере один, два, три, четыре дня, или дольше, и введение можно повторять в соответствии с решением врача до того момента, когда состояние будет устранено или взято под контроль. В случае пре-HUS ингибирующее MASP-2 средство можно вводить субъекту системно, например, внутриартериальным, внутривенным, внутримышечным, ингаляционным, назальным, подкожным или другим парентеральным путем введения.

Лечение инфекции, вызываемой E. coli 0157:H7, бактерицидными антибиотиками, в частности, β-лактамами, связано с повышенным риском развития HUS (Smith et al., Pediatr Infect Dis J 31(1):37-41 (2012). В некоторых вариантах осуществления в случае субъекта, страдающего от симптомов, связанных с фазой пре-HUS, который, как известно имеет инфекцию, вызываемую энтерогенной E. coli, при которой использование антибиотиков противопоказано (например, E. coli 0157:H7), предложен способ

уменьшения риска развития HUS, или уменьшения вероятности развития почечной недостаточности у субъекта, включающий введение ингибирующего MASP-2 средства в определенном количестве в течение первого периода времени, эффективного для ингибирования или предотвращения олигурии у субъекта (например, в течение по меньшей мере одного, двух, трех или четырех дней), при этом введение ингибирующего MASP-2 средства в течение первого периода времени выполняют без использования антибиотика. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение ингибирующего MASP-2 средства субъекту в сочетании с антибиотиком в течение второго периода времени (например, по меньшей мере одной-двух недель).

В других вариантах осуществления в случае субъекта, страдающего от симптомов, связанных с фазой пре-HUS, который, как известно имеет инфекцию, вызываемую Shigella или Salmonella, предложен способ уменьшения риска развития HUS, или уменьшения вероятности развития почечной недостаточности у субъекта, включающий введение ингибирующего MASP-2 средства в определенном количестве в течение периода времени, эффективного для ингибирования или предотвращения олигурии у субъекта, при этом введение ингибирующего MASP-2 средства выполняют либо с использованием, либо без использования, соответствующего антибиотика.

В некоторых вариантах осуществления в случае первичного диагностирования aHUS, или в случае субъекта, имеющего один или более симптомов, согласующихся с диагнозом aHUS (например, почечную недостаточность или микроангиопатическую гемолитическую анемию без низкого уровня фибриногена, или тромбоцитопению), субъекту вводят эффективное количество ингибирующего MASP-2 средства (например, анти-MASP-2 антитела) в качестве терапии первой линии без плазмафереза или в сочетании с плазмаферезом. В качестве первой линии терапии ингибирующее MASP-2 средство можно вводить субъекту системно, например, внутриартериальным, внутривенным, внутримышечным, ингаляционным, назальным, подкожным или другим парентеральным путем введения. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 средство вводят субъекту в качестве терапии первой линии без плазмафереза во избежание потенциальных осложнений плазмафереза, включающих кровотечение, инфицирование и воздействие болезнетворных и/или аллергических факторов, присутствующих в плазме донора, или в случае субъекта, отвергающего плазмаферез, или в условиях, когда плазмаферез недоступен.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ингибирующего MASP-2 средства субъекту, страдающему от HUS, через катетер (например, внутривенно) в течение первого периода времени (например, острой фазы, продолжающейся в течение по меньшей мере одного дня или недели, или двух недель), с последующим введением ингибирующего MASP-2 средства субъекту подкожно в течение второго периода времени (например, хронической фазы, продолжающейся в течение по меньшей мере двух недель, или дольше). В некоторых вариантах осуществления введение в первый и/или второй период времени выполняют без плазмафереза. В некоторых вариантах осуществления

способ дополнительно включает определение уровня по меньшей мере одного фактора комплемента (например, C3, C5) у субъекта до начала лечения и, необязательно, в процессе лечения, при этом определение сниженного уровня по меньшей мере одного фактора комплемента в сравнении со стандартным значением, или значением у здорового контрольного субъекта, указывает на необходимость лечения, и при этом определение нормального уровня указывает на улучшение состояния.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ингибирующего MASP-2 средства, такого как анти-MASP-2 антитело, субъекту, страдающему от, или имеющему риск развития, HUS, подкожно или внутривенно. Предпочтительно, введение выполняют ежедневно, но можно выполнять не чаще, чем еженедельно или ежемесячно. Лечение будет продолжаться в течение по меньшей мере одной недели и вплоть до 3 месяцев. Анти-MASP-2 антитело можно вводить отдельно или в сочетании с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

TTP:

Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (TTP) представляет собой опасное для жизни заболевание системы свертывания крови, вызываемое аутоиммунными или наследственными дисфункциями, которые активируют каскад коагуляции или систему комплемента (George, JN, N Engl J Med; 354:1927-35 (2006)). Это приводит к образованию многочисленных микроскопических сгустков, или тромбозу, в мелких кровеносных сосудах во всем теле. На эритроциты действует сила сдвига, которая повреждает их мембраны, что приводит к внутрисосудистому гемолизу. В результате снижение кровотока и эндотелиальные повреждения приводят к повреждению органов, включая мозг, сердце и почки. TTP клинически характеризуется наличием тромбоцитопении, микроангиопатической гемолитической анемии, неврологических изменений, почечной недостаточности и лихорадки. В эпоху до применения плазмафереза смертность составляла 90% во время острых приступов. Даже при использовании плазмафереза выживаемость через шесть месяцев составляет примерно 80%.

TTP может развиваться вследствие генетического или приобретенного ингибирования фермента ADAMTS-13, металлопротеиназы, ответственной за расщепление крупных мультимеров фактора фон Виллебранда (vWF) на более мелкие единицы. Ингибирование или дефицит ADAMTS-13 в итоге приводит к повышенной коагуляции (Tsai, H. J Am Soc Nephrol 14: 1072-1081, (2003)). ADAMTS-13 регулирует активность vWF; в его отсутствие vWF образует крупные мультимеры, которые чаще связывают тромбоциты и создают у пациентов предрасположенность к агрегации тромбоцитов и тромбозу в микрососудистом русле.

Синдром Апшо-Шульмана (USS, также называемый врожденной TTP) представляет собой наследственную недостаточность активности ADAMTS-13 вследствие мутаций в гене ADAMTS-13 (Schulman et al., Blood, 16(1):943-57, 1960; Upshaw et al., New Engl. J. Med, 298 (24):1350-2, 1978). Многочисленные мутации в гене ADAMTS-13 были идентифицированы у индивидуумов с врожденной TTP (Kinoshita et al., International

Journal of Hematology, 74:101-108 (2001); Levy et al., Nature, 413 (6855):488-494 (2001); Kokame et al., PNAS 99(18):11902-11907 (2002); Savasan et al., Blood, 101:4449-4451 (2003); Matsumoto et al., Blood, 103:1305-1310 (2004) и Fujimura et al., Brit. J. Haemat 144:742-754 (2008)). У субъектов с USS, как правило, активность ADAMTS-13 составляет 5-10% от нормальной (Kokame et al., PNAS 99(18):11902-11907, 2002). Хотя приобретенная TTP и USS имеют некоторое сходство, USS имеет некоторые важные различия в клинических признаках. USS, как правило, проявляется в младенческом или детском возрасте и характеризуется тяжелой гипербилирубинемией, с отрицательными результатами теста Кумбса, вскоре после рождения, реакцией на инфузию свежей плазмы и частыми рецидивами (Savasan et al., Blood, 101:4449-4451, 2003). В некоторых случаях пациенты с наследственным дефицитом ADAMTS-13 имеют слабое фенотипическое проявление при рождении, и у них симптомы, связанные с TTP, проявляются лишь в клинических ситуациях, при которых повышаются уровни фактора фон Виллебранда, таких как инфекция или беременность. Например, Fujimura с соавторами сообщали о 9 японских женщинах из 6 семей с генетически подтвержденным USS, у которых заболевание было диагностировано во время их первой беременности. Тромбоцитопения, возникающая в течение второго-третьего триместра в каждой из их 15 беременностей, часто сопровождалась TTP. У каждой из этих женщин была обнаружена тяжелая недостаточность активности ADAMTS-13 (Fujimura et al., Brit. J. Haemat 144:742-754, 2008).

В соответствии с вышеизложенным, в некоторых вариантах осуществления в случае субъекта с синдромом Апшо-Шульмана (USS) (то есть, субъекта, который, как известно, имеет недостаточность активности ADAMTS-13, и/или субъекта, который, как известно, имеет одну или более мутаций в гене ADAMTS-13), предложен способ уменьшения вероятности развития клинических симптомов, связанных с врожденной TTP (например, тромбоцитопении, анемии, лихорадки и/или почечной недостаточности), включающий введение определенного количества ингибирующего MASP-2 средства (например, анти-MASP-2 антитела) в течение периода времени, эффективного для облегчения или предотвращения одного или более клинических симптомов, связанных с TTP. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап определения того, имеет ли субъект риск развития симптомов, связанных с врожденной TTP, до начала развития каких-либо симптомов, связанных с TTP, или после начала развития по меньшей мере одного или более симптомов, характерных для TTP (например, анемии, тромбоцитопении и/или почечной недостаточности). Определение того, имеет ли субъект риск развития симптомов, связанных с врожденной TTP (то есть, субъект имеет USS), включает определение того, имеет ли субъект мутацию в гене, кодирующем ADAMTS-13, и/или определение того, имеет ли субъект недостаточность активности ADAMTS-13, и/или определение того, имеет ли субъект USS в семейном анамнезе. Способы генетического скрининга на наличие или отсутствие генетической мутации, связанной с USS, хорошо известны, например, смотри Kinoshita et al., International Journal

of Hematology, 74:101-108 (2001); Levy et al., Nature, 413 (6855):488-494 (2001); Kokame et al., PNAS 99(18):11902-11907 (2002); Savasan et al., Blood, 101:4449-4451 (2003); Matsumoto et al., Blood, 103:1305-1310 (2004) и Fujimura et al., Brit. J. Haemat 144:742-754 (2008).

В одном варианте осуществления предложен способ уменьшения вероятности того, что субъект, имеющий диагностированный USS, будет страдать от клинических симптомов, связанных с TTP, включающий периодический мониторинг субъекта для определения наличия или отсутствия анемии, тромбоцитопении или повышенного уровня креатинина, и лечение ингибирующим MASP-2 средством (например, анти-MASP-2 антителом) при определении наличия анемии, тромбоцитопении или повышенного уровня креатинина, или при наличии события, которое, как известно, связано с инициированием клинических симптомов TTP, например, воздействия лекарственного средства (например, химиотерапии), инфекции (например, бактериальной инфекции), злокачественного новообразования, травмы, трансплантации или беременности.

В другом варианте осуществления предложен способ лечения субъекта с USS, страдающего от клинических симптомов, связанных с TTP, включающий введение определенного количества ингибирующего MASP-2 средства (например, анти-MASP-2 антитела) в течение периода времени, эффективного для облегчения или предотвращения одного или более клинических симптомов, связанных с TTP.

TTP также может развиваться вследствие наличия аутоантител против ADAMTS-13. Кроме того, TTP может развиваться на фоне рака молочной железы, желудочно-кишечного тракта или предстательной железы (George JN., Oncology (Williston Park). 25:908-14 (2011)), беременности (второй триместр или после родов), George JN., Curr Opin Hematol 10:339-344 (2003)), или в связи с такими заболеваниями, как ВИЧ или аутоиммунные заболевания, такие как системная красная волчанка (Hamasaki K, et al., Clin Rheumatol. 22:355-8 (2003)). TTP также может быть вызвана некоторыми терапевтическими средствами, включая гепарин, хинин, иммуно-опосредованный ингредиент, противораковые химиотерапевтические средства (блеомицин, цисплатин, цитозин арабинозид, дауномицин гемцитабин, митомицин С и тамоксифен), циклоспорин А, пероральные контрацептивы, пенициллин, рифампин и противотромбозные лекарственные средства, включая тиклопидин и клопидогрел (Azarm, T. et al., J Res Med Sci., 16: 353-357 (2011)). Другими факторами или условиями, связанными с TTP, являются токсины, такие как пчелиный яд, сепсис, секвестрация селезенки, трансплантация, васкулит, хирургическая операция на сосудах и инфекции, такие как вызываемая Streptococcus пневмония и вызываемая цитомегаловирусом инфекция (Moake JL., N Engl J Med., 347:589-600 (2002)). TTP вследствие временной функциональной недостаточности ADAMTS-13 может развиваться как последствие повреждения эндотелиальных клеток, связанного с инфекцией, вызываемой S. pneumonia (Pediatr Nephrol., 26:631-5 (2011)).

Плазмаферез является стандартным методом лечения TTP (Rock GA, et al., N Engl J Med 325:393-397 (1991)). Плазмаферез позволяет возмещать недостаток активности ADAMTS-13 у пациентов с генетическими дефектами и удалять аутоантитела к ADAMTS-

13 у пациентов с приобретенной аутоиммунной TTP (Tsai, H-M, Hematol Oncol Clin North Am., 21(4): 609-v (2007)). В лечении обычно используют дополнительные средства, такие как иммунодепрессанты (George, JN, N Engl J Med, 354:1927-35 (2006)). Однако плазмаферез не является успешным для примерно 20% пациентов, у более чем трети пациентов возникает рецидив, и плазмаферез также является дорогостоящей и технически сложной процедурой. Более того, многие пациенты не способны переносить плазмаферез. Следовательно, сохраняется острая потребность в дополнительных, более эффективных методах лечения TTP.

Поскольку TTP является нарушением каскада свертывания крови, лечение антагонистами системы комплемента может способствовать стабилизации и ослаблению заболевания. При том, что патологическая активация альтернативного пути комплемента связана с aHUS, роль активации комплемента при TTP менее понятна. Функциональная недостаточность ADAMTS-13 является важной для предрасположенности к TTP, однако ее недостаточно для вызывания острых приступов. Экологические факторы и/или другие генетические вариации могут вносить вклад в проявление TTP. Например, гены, кодирующие белки, участвующие в регуляции каскада коагуляции, vWF, функции тромбоцитов, компонентов эндотелия поверхности сосудов или системы комплемента, могут вносить свой вклад в развитие острой тромботической микроангиопатии (Galbusera, M. et al., Haematologica, 94: 166-170 (2009)). В частности, показано, что очень важную роль играет активация комплемента; известно, что сыворотка субъектов с тромботической микроангиопатией, связанной с недостаточностью ADAMTS-13, вызывает отложение C3 и MAC, и последующую активацию нейтрофилов, что может быть отменено путем инактивации комплемента (Ruiz-Torres MP, et al., Thromb Haemost, 93:443-52 (2005)). Кроме того, недавно было показано, что во время острых приступов TTP имеют место повышенные уровни C4d, C3bBbP и C3a (M. Réti et al., J Thromb Haemost. Feb 28.(2012) doi: 10.1111/j.1538-7836.2012,04674.x. [электронная публикация до выхода в печать]), что согласуется с активацией классического/лектинового и альтернативного путей. Эта повышенная степень активации комплемента при острых эпизодах может инициировать активацию терминального пути и являться причиной последующих осложнений TTP.

Роль ADAMTS-13 и vWF при TTP, несомненно, заключается в активации и агрегации тромбоцитов и их последующем участии в создании силы сдвига и отложений при микроангиопатиях. Активированные тромбоциты взаимодействуют и запускают как классический, так и альтернативный, пути комплемента. Опосредованная тромбоцитами активация комплемента приводит к повышению уровня воспалительных медиаторов C3a и C5a (Peerschke E et al., Mol Immunol, 47:2170-5 (2010)). Таким образом, тромбоциты могут служить в качестве мишеней при классической активации комплемента в случае наследственной или аутоиммунной TTP.

Как описано выше, лектиновый путь комплемента, в силу опосредованной MASP-2 активации протромбина, является основным молекулярным путем, связывающим повреждение эндотелия с коагуляцией и тромбозом микрососудов, происходящими при

HUS. Аналогично, активация лектинового пути комплемента может непосредственно управлять системой коагуляции при TTP. Активация лектинового пути может запускаться в ответ на начальное повреждение эндотелия, вызываемое недостаточностью ADAMTS-13 при TTP. Вследствие этого ожидается, что ингибиторы лектинового пути, включая, но без ограничения, антитела, блокирующие функцию MASP-2, будут облегчать микроангиопатии, связанные с микрососудистой коагуляцией, тромбозом и гемолизом, у пациентов страдающих от TTP.

Пациенты, страдающие от TTP, как правило, поступают в отделение неотложной помощи с одним или более из следующего: пурпура, почечная недостаточность, низкий уровень тромбоцитов, анемия и/или тромбоз, включая инсульт. Современный стандарт оказания медицинской помощи при TTP включает проведение через катетер (например, внутривенный или иной катетер) заместительного плазмафереза на протяжении двух недель, или дольше, как правило, трех раз в неделю, вплоть до ежедневной процедуры. Если субъект имеет положительные результаты теста на наличие ингибитора ADAMTS-13 (то есть, эндогенное антитело против ADAMTS-13), тогда плазмаферез можно проводить в сочетании с иммунодепрессантами (например, кортикостероидами, ритуксаном или циклоспорином). Субъекты с рефрактерной TTP (примерно 20% пациентов с TTP) не отвечают на продолжающуюся в течение по меньшей мере двух недель терапию с использованием плазмафереза.

В соответствии с вышеизложенным, в некоторых вариантах осуществления в случае первичного диагностирования TTP, или в случае субъекта, имеющего один или более симптомов, согласующихся с диагнозом TTP (например, поражение центральной нервной системы, тяжелую тромбоцитопению (количество тромбоцитов, меньшее или равное 5000/мкл без аспирина, меньшее или равное 20000/мкл при приеме аспирина), тяжелое поражение сердца, тяжелое поражение легких, инфаркт кишечника или гангрену), предложен способ лечения субъекта эффективным количеством ингибирующего MASP-2 средства (например, анти-MASP-2 антитела) в качестве первой линии терапии без плазмафереза или в сочетании с плазмаферезом. В качестве первой линии терапии ингибирующее MASP-2 средство можно вводить субъекту системно, например, внутриартериальным, внутривенным, внутримышечным, ингаляционным, назальным, подкожным или другим парентеральным путем введения. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 средство вводят субъекту в качестве терапии первой линии без плазмафереза во избежание потенциальных осложнений плазмафереза, включающих кровотечение, инфицирование и воздействие болезнетворных и/или аллергических факторов, присутствующих в плазме донора, или в случае субъекта, отвергающего плазмаферез, или в условиях, когда плазмаферез недоступен. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 средство вводят субъекту, страдающему от TTP, в сочетании (включая совместное введение) с иммунодепрессантом (например, кортикостероидами, ритуксаном или циклоспорином) и/или в сочетании с концентрированным ADAMTS-13.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ингибирующего MASP-2 средства субъекту, страдающему от TTP, через катетер (например, внутривенно) в течение первого периода времени (например, острой фазы, продолжающейся в течение по меньшей мере одного дня или недели, или двух недель), с последующим введением ингибирующего MASP-2 средства субъекту подкожно в течение второго периода времени (например, хронической фазы, продолжающейся в течение по меньшей мере двух недель, или дольше). В некоторых вариантах осуществления введение в первый и/или второй период времени выполняют без плазмафереза. В некоторых вариантах осуществления способ используют в качестве поддерживающей терапии для предотвращения страданий субъекта от одного или более симптомов, связанных с TTP.

В другом варианте осуществления предложен способ лечения субъекта, страдающего от рефрактерной TTP (то есть, субъекта, который не отвечал на проведение плазмефереза в течение по меньшей мере двух недель), путем введения ингибитора MASP-2 в количестве, эффективном для уменьшения одного или более симптомов TTP. В одном варианте осуществления ингибитор MASP-2 (например, анти-MASP-2 антитело) вводят субъекту с рефрактерной TTP на постоянной основе в течение периода времени, составляющего по меньшей мере две недели, или дольше, подкожным или другим парентеральным путем введения. Введение можно повторять в соответствии с решением врача до того момента, когда состояние будет устранено или взято под контроль.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня по меньшей мере одного фактора комплемента (например, C3, C5) у субъекта до начала лечения и, необязательно, в процессе лечения, при этом определение сниженного уровня по меньшей мере одного фактора комплемента в сравнении со стандартным значением, или значением у здорового контрольного субъекта, указывает на необходимость продолжения лечения ингибирующим MASP-2 средством.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ингибирующего MASP-2 средства, такого как анти-MASP-2 антитело, субъекту, страдающему от, или имеющему риск развития, TTP, подкожно или внутривенно. Предпочтительно, введение выполняют ежедневно, но можно выполнять не чаще, чем раз в две недели. Введение продолжают до тех пор, когда количество тромбоцитов у субъекта достигает уровня, превышающего 150000/мл, в течение по меньшей мере двух последовательных дней. Анти-MASP-2 антитело можно вводить отдельно или в сочетании с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело имеет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческий MASP-2 с величиной K_D, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в домене CCP1 MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в in vitro анализе в 1% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее, при этом

антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', $F(ab)_2$ и $F(ab')_2$, при этом антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG2, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, при этом молекула IgG4 имеет мутацию S228P, и/или при этом антитело существенно не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не ингибирует альтернативный путь. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не ингибирует классический путь или альтернативный путь (то есть, ингибирует лектиновый путь, при этом не затрагивая классический и альтернативный пути комплемента).

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке субъекта, страдающего от TTP, на по меньшей мере 30%, например, по меньшей мере 40%, например, по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80% например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, вплоть до 99%, в сравнении с контрольной сывороткой. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке субъекта, страдающего от TTP, на уровне, по меньшей мере на 20 процентов или более (например, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%) превышающем ингибирующий эффект на отложение C5b-9 в сыворотке.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке пациента с TTP на по меньшей мере 30%, например, по меньшей мере 40%, например, по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80% например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, вплоть до 99% в сравнении с контрольной сывороткой.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту способом доставки через внутривенный катетер или другой катетер.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования образования тромбов у субъекта, страдающего от TTP, включающему введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего (I) (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: i) CDR-H1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 31-35 в SEQ ID NO: 67; и ii) CDR-H2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-65 в SEQ ID NO: 67; и iii) CDR-H3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 95-102 в SEQ ID NO: 67, и b) вариабельную область легкой цепи, содержащую: i) CDR-L1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 24-34 в SEQ ID NO: 70; и ii) CDR-L2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность

остатков 50-56 в SEQ ID NO: 70; и iii) CDR-L3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 89-97 в SEQ ID NO: 70, или (II) его варианта, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67), и вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически узнает по меньшей мере часть эпитопа на человеческом MASP-2, узнаваемого эталонным антителом OMS646, содержащим вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 70.

Болезнь Дегоса

Болезнь Дегоса, также известная как злокачественный атрофический папулез, является очень редким видом ТМА, при котором поражаются мелкие сосуды кожи, желудочно-кишечного тракта и ЦНС. Эта васкулопатия вызывает окклюзию венул и артериол, что приводит к поражениям кожи, кишечной ишемии и нарушениям ЦНС, включая инсульт, эпилепсию и когнитивные нарушения. В коже развивается некроз соединительной ткани вследствие тромботической окклюзии мелких артерий. Однако причина болезни Дегоса неизвестна. Предполагают участие васкулита, коагулопатии или первичной дисфункции эндотелиальных клеток. Уровень выживаемости при болезни Дегоса составляет 50% в течение всего лишь от двух до трех лет. Эффективное лечение для болезни Дегоса отсутствует, хотя используют антитромбоцитарные лекарственные средства, антикоагулянты и иммунодепрессанты для облегчения симптомов.

Хотя механизм болезни Дегоса неизвестен, предполагают участие пути комплемента. Margo с соавторами обнаружили выраженные отложения C5b-9 в сосудах кожи, желудочно-кишечного тракта и мозга у четырех скончавшихся пациентов с болезнью Дегоса (Margo et al., Am J Clin Pathol 135(4):599-610, 2011). Экспериментальное

лечение экулизумабом исходно было эффективным для лечения кожных и кишечных лезий, но не предотвращало прогрессирование системного заболевания (смотри Garrett-Bakelman F. et al., «C5b-9 is a potential effector in the pathophysiology of Degos disease; a case report of treatment with eculizumab» (Abstract), Jerusalem: International Society of Hematology; 2010, Poster №156; и Polito J. et al., «Early detection of systemic Degos disease (DD) or malignant atrophic papulosis (MAP) may increase survival» (Abstract), San Antonio, TX: American College of Gastroenterology; 2010, Poster №1205).

Многие пациенты, страдающие от болезни Дегоса, имеют нарушения свертывания крови. Тромботическая окклюзия мелких артерий в коже является характерным признаком заболевания. Поскольку в это заболевание вовлечен путь комплемента, как описано в настоящем документе для других TMA, ожидается, что ингибиторы лектинового пути, включая, но без ограничения, антитела, блокирующие функцию MASP-2, будут полезны в лечении пациентов, страдающих от болезни Дегоса.

Соответственно, в другом варианте осуществления изобретение относится к способам лечения болезни Дегоса путем введения композиции, содержащей терапевтически эффективное количество ингибирующего MASP-2 средства, такого как анти-MASP-2 антитело, в фармацевтическом носителе субъекту, страдающему от болезни Дегоса, или состояния, связанного с болезнью Дегоса. Ингибирующее MASP-2 средство вводят субъекту, страдающему от болезни Дегоса, или состояния, связанного с болезнью Дегоса, системно, например, внутриартериальным, внутривенным, внутримышечным, ингаляционным, назальным, подкожным или другим парентеральным путем введения, или, потенциально, пероральным путем введения в случае не пептидергических средств. Анти-MASP-2 антитело можно вводить отдельно или в сочетании с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело имеет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческий MASP-2 с величиной K_D, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в домене CCP1 MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в in vitro анализе в 1% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее, при этом антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', $F(ab)_2$ и $F(ab')_2$, при этом антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG2, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, при этом молекула IgG4 имеет мутацию S228P, и/или при этом антитело существенно не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не ингибирует альтернативный путь. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не

ингибирует классический путь или альтернативный путь (то есть, ингибирует лектиновый путь, при этом не затрагивая классический и альтернативный пути комплемента).

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке субъекта, страдающего от болезни Дегоса, на по меньшей мере 30%, например, по меньшей мере 40%, например, по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80% например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, вплоть до 99% в сравнении с контрольной сывороткой. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке субъекта, страдающего от болезни Дегоса, на уровне, по меньшей мере на 20 процентов или более (например, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%) превышающем ингибирующий эффект на отложение C5b-9 в сыворотке.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке пациента с болезнью Дегоса на по меньшей мере 30%, например, по меньшей мере 40%, например, по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80% например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% вплоть до 99% в сравнении с контрольной сывороткой.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту способом доставки через внутривенный катетер или другой катетер.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования образования тромбов у субъекта, страдающего от болезни Дегоса, включающему введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего (I) (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: i) CDR-H1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 31-35 в SEQ ID NO: 67; и ii) CDR-H2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-65 в SEQ ID NO: 67; и iii) CDR-H3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 95-102 в SEQ ID NO: 67, и b) вариабельную область легкой цепи, содержащую: i) CDR-L1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 24-34 в SEQ ID NO: 70; и ii) CDR-L2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-56 в SEQ ID NO: 70; и iii) CDR-L3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 89-97 в SEQ ID NO: 70, или (II) его варианта, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67), и вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90%

идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически узнает по меньшей мере часть эпитопа на человеческом MASP-2, узнаваемого эталонным антителом OMS646, содержащим вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 70.

Катастрофический антифосфолипидный синдром (CAPS)

Катастрофический антифосфолипидный синдром (CAPS) представляет собой экстремальный вариант синдрома антифосфолипидных антител (APLA). CAPS характеризуется венозным и артериальным тромбозом вследствие патогенных антител. CAPS представляет собой TMA с тромбозом, ишемией нескольких органов и полиорганной недостаточностью. Как и в других TMA, характерной особенностью является окклюзия мелких сосудов в различных органах. CAPS имеет высокий уровень смертности, составляющий примерно 50%, и часто связан с инфекцией или травмой. Пациенты имеют антифосфолипидные антитела, как правило, IgG.

Клинические признаки CAPS включают наличие по меньшей мере трех органов или тканей с гистопатологическим свидетельством окклюзии мелких сосудов. Периферический тромбоз может затрагивать вены и артерии в ЦНС, сердечно-сосудистой, почечной или легочной системах. Пациенты получают антибиотики, антикоагулянты, кортикостероиды, плазмаферез и внутривенный иммуноглобулин. Тем не менее, полиорганная недостаточность может приводить к смерти.

Предполагают участие пути комплемента в CAPS. Например, исследования на животных моделях показывают, что ингибирование комплемента может являться эффективным способом предотвращения тромбоза, связанного с CAPS (Shapira L. et al., Arthritis Rheum 64(8):2719-23, 2012). Более того, как также сообщали Shapira с соавторами, введение экулизумаба субъекту, страдающему от CAPS, в дозах, приводящих к блокированию пути комплемента, устраняло острые прогрессирующие тромботические явления и обращало вспять тромбоцитопению (смотри также Lim W., Curr Opin Hematol 18(5):361-5, 2011). Таким образом, как описано в настоящем документе для других TMA,

ожидается, что ингибиторы лектинового пути, включая, но без ограничения, антитела, блокирующие функцию MASP-2, будут полезны в лечении пациентов, страдающих от CAPS.

Соответственно, в другом варианте осуществления изобретение относится к способам лечения CAPS путем введения композиции, содержащей терапевтически эффективное количество ингибирующего MASP-2 средства, такого как анти-MASP-2 антитело, в фармацевтическом носителе субъекту, страдающему от CAPS, или состояния, связанного с CAPS. Ингибирующее MASP-2 средство вводят субъекту, страдающему от CAPS, или состояния, связанного с CAPS, системно, например, внутриартериальным, внутривенным, внутримышечным, ингаляционным, назальным, подкожным или другим парентеральным путем введения, или, потенциально, пероральным путем введения в случае не пептидергических средств. Анти-MASP-2 антитело можно вводить отдельно или в сочетании с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело имеет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческий MASP-2 с величиной K_D, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в домене CCP1 MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в in vitro анализе в 1% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее, при этом антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', $F(ab)_2$ и $F(ab')_2$, при этом антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG2, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, при этом молекула IgG4 имеет мутацию S228P, и/или при этом антитело существенно не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не ингибирует альтернативный путь. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не ингибирует классический путь или альтернативный путь (то есть, ингибирует лектиновый путь, при этом не затрагивая классический и альтернативный пути комплемента).

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке субъекта, страдающего от CAPS, на по меньшей мере 30%, например, по меньшей мере 40%, например, по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80% например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, вплоть до 99% в сравнении с контрольной сывороткой. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке субъекта, страдающего от CAPS, на уровне, по меньшей мере на 20 процентов или более (например, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере

50%) превышающем ингибирующий эффект на отложение C5b-9 в сыворотке.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке пациента с CAPS на по меньшей мере 30%, например, по меньшей мере 40%, например, по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80% например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% вплоть до 99% в сравнении с контрольной сывороткой.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту способом доставки через внутривенный катетер или другой катетер.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования образования тромбов у субъекта, страдающего от CAPS, включающему введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего (I) (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: i) CDR-H1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 31-35 в SEQ ID NO: 67; и ii) CDR-H2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-65 в SEQ ID NO: 67; и iii) CDR-H3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 95-102 в SEQ ID NO: 67, и b) вариабельную область легкой цепи, содержащую: i) CDR-L1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 24-34 в SEQ ID NO: 70; и ii) CDR-L2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-56 в SEQ ID NO: 70; и iii) CDR-L3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 89-97 в SEQ ID NO: 70, или (II) его варианта, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67), и вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту

композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически узнает по меньшей мере часть эпитопа на человеческом MASP-2, узнаваемого эталонным антителом OMS646, содержащим вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 70.

ТМА вследствие рака

Системные злокачественные новообразования разного вида могут приводить к клиническим и патологическим проявлениям ТМА (смотри, например, Batts and Lazarus, Bone Marrow Transplantation 40:709-719, 2007). Связанная с раком ТМА часто бывает обнаружена в легких и, судя по всему, связана с опухолевыми эмболами (Francis KK et al., Commun Oncol 2:339-43, 2005). Опухолевые эмболы могут уменьшать ток крови и, таким образом, приводить к гипоперфузионному состоянию в пораженных артериолах и венулах. Возникающие вследствие этого стресс и повреждение тканей, предположительно, локализованным образом активируют лектиновый путь комплемента. Активированный лектиновый путь, в свою очередь, может активировать каскад коагуляции через MASP-2-зависимое расщепление протромбина до тромбина, приводя к протромботическому состоянию, характерному для ТМА. Ожидается, что ингибирование MASP-2 в этом случае будет уменьшать локализованную активацию тромбина и, таким образом, облегчать протромботическое состояние.

Таким образом, как описано в настоящем документе для других ТМА, ожидается, что ингибиторы лектинового пути, включая, но без ограничения, антитела, блокирующие функцию MASP-2, будут полезны в лечении пациентов, страдающих от ТМА вследствие рака.

Соответственно, в другом варианте осуществления изобретение относится к способам лечения или предотвращения ТМА вследствие рака путем введения композиции, содержащей терапевтически эффективное количество ингибирующего MASP-2 средства, такого как анти-MASP-2 антитело, в фармацевтическом носителе субъекту, страдающему от, или имеющему риск развития, ТМА вследствие рака. Ингибирующее MASP-2 средство вводят субъекту, страдающему от, или имеющему риск развития, ТМА вследствие рака, системно, например, внутриартериальным, внутривенным, внутримышечным, ингаляционным, назальным, подкожным или другим парентеральным путем введения, или, потенциально, пероральным путем введения в случае не пептидергических средств. Анти-MASP-2 антитело можно вводить отдельно или в сочетании с ингибитором С5, таким как экулизумаб.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело имеет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческий MASP-2 с величиной K_D, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в домене CCP1 MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в in vitro анализе в 1% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее, при этом

антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', $F(ab)_2$ и $F(ab')_2$, при этом антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG2, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, при этом молекула IgG4 имеет мутацию S228P, и/или при этом антитело существенно не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не ингибирует альтернативный путь. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не ингибирует классический путь или альтернативный путь (то есть, ингибирует лектиновый путь, при этом не затрагивая классический и альтернативный пути комплемента).

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке субъекта, страдающего от TMA вследствие рака, на по меньшей мере 30%, например, по меньшей мере 40%, например, по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80% например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% вплоть до 99% в сравнении с контрольной сывороткой.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке пациента, страдающего от TMA вследствие рака, на по меньшей мере 30%, например, по меньшей мере 40%, например, по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80% например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% вплоть до 99% в сравнении с контрольной сывороткой.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту способом доставки через внутривенный катетер или другой катетер.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования образования тромбов у субъекта, страдающего от TMA вследствие рака, включающему введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего (I) (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: i) CDR-H1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 31-35 в SEQ ID NO: 67; и ii) CDR-H2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-65 в SEQ ID NO: 67; и iii) CDR-H3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 95-102 в SEQ ID NO: 67, и b) вариабельную область легкой цепи, содержащую: i) CDR-L1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 24-34 в SEQ ID NO: 70; и ii) CDR-L2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-56 в SEQ ID NO: 70; и iii) CDR-L3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 89-97 в SEQ ID NO: 70, или (II) его варианта, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67

(например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67), и вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически узнает по меньшей мере часть эпитопа на человеческом MASP-2, узнаваемого эталонным антителом OMS646, содержащим вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 70.

ТМА вследствие противораковой химиотерапии

Связанная с химиотерапией ТМА представляет собой состояние, включающее тромбоцитопению, микроангиопатическую гемолитическую анемию и почечную дисфункцию, которое развивается у 2-10% пациентов со злокачественными новообразованиями в анамнезе, получавших химиотерапевтические средства, такие как гемцитабин, митомицин, оксалиплатин и другие. Связанная с химиотерапией ТМА характеризуется неблагоприятными клиническими результатами с высоким уровнем смертности (смотри, например, Blake-Haskins et al., Clin Cancer Res 17(18):5858-5866, 2011).

Считают, что этиология ТМА вследствие химиотерапии связана с неспецифическим токсическим повреждением микроваскулярного эндотелия. Непосредственное повреждение эндотелиальных клеток было продемонстрировано в животной модели индуцированной митомицином ТМА (Dlott J. et al., Ther Apher Dial 8:102-11, 2004). Показано, что повреждение эндотелиальных клеток за счет различных механизмов приводит к активации лектинового пути комплемента. Например, Stahl с соавторами показали, что эндотелиальные клетки, подвергнутые окислительному стрессу, активируют лектиновый путь комплемента как in vitro, так и in vivo (Collard et al., Am J Pathol. 156(5):1549-56, 2000; La Bonte et al., J Immunol. 15;188(2):885-91, 2012). In vivo этот процесс приводит к тромбозу, и показано, что ингибирование лектинового пути

предотвращает тромбоз (La Bonte et al. J Immunol. 15;188(2):885-91, 2012). Кроме того, как продемонстрировано в примерах 37-39 в настоящем документе, в мышиной модели TMA, в которой локализованное возбуждение фотонами FITC-Dex было использовано для индукции локализованного повреждения микрососудистого русла, с последующим развитием ответа в виде TMA, авторы настоящего изобретения показали, что ингибирование MASP-2 может предотвращать TMA. Таким образом, повреждение микроваскулярного эндотелия химиотерапевтическими средствами может активировать лектинововый путь комплемента, который затем создает локализованное протромботическое состояние и стимулирует ответ в виде TMA. Поскольку активация лектинового пути и создание протромботического состояния зависит от MASP-2, ожидается, что ингибиторы MASP-2, включая, но без ограничения, антитела, блокирующие функцию MASP-2, будут приводить к уменьшению ответа в виде TMA и уменьшению риска развития связанной с противораковой химиотерапией TMA.

Соответственно, в другом варианте осуществления изобретение относится к способам лечения или предотвращения TMA вследствие химиотерапии путем введения композиции, содержащей терапевтически эффективное количество ингибирующего MASP-2 средства, такого как анти-MASP-2 антитело, в фармацевтическом носителе субъекту, страдающему от, или имеющему риск развития, TMA вследствие химиотерапии. Ингибирующее MASP-2 средство вводят субъекту, который получал, получает или будет получать химиотерапию, системно, например, внутриартериальным, внутривенным, внутримышечным, ингаляционным, назальным, подкожным или другим парентеральным путем введения, или, потенциально, пероральным путем введения в случае не пептидергических средств. Анти-MASP-2 антитело можно вводить отдельно или в сочетании с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело имеет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческий MASP-2 с величиной K_D, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в домене CCP1 MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в in vitro анализе в 1% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее, при этом антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', $F(ab)_2$ и $F(ab')_2$, при этом антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG2, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, при этом молекула IgG4 имеет мутацию S228P, и/или при этом антитело существенно не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не ингибирует альтернативный путь. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не

ингибирует классический путь или альтернативный путь (то есть, ингибирует лектиновый путь, при этом не затрагивая классический и альтернативный пути комплемента).

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке субъекта, страдающего от TMA вследствие химиотерапии, на по меньшей мере 30%, например, по меньшей мере 40%, например, по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80% например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% вплоть до 99% в сравнении с контрольной сывороткой.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке пациента, страдающего от TMA вследствие противораковой химиотерапии, на по меньшей мере 30%, например, по меньшей мере 40%, например, по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80% например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% вплоть до 99% в сравнении с контрольной сывороткой.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту способом доставки через внутривенный катетер или другой катетер.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования образования тромбов у субъекта, страдающего от TMA вследствие противораковой химиотерапии, включающему введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего (I) (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: i) CDR-H1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 31-35 в SEQ ID NO: 67; и ii) CDR-H2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-65 в SEQ ID NO: 67; и iii) CDR-H3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 95-102 в SEQ ID NO: 67, и b) вариабельную область легкой цепи, содержащую: i) CDR-L1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 24-34 в SEQ ID NO: 70; и ii) CDR-L2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-56 в SEQ ID NO: 70; и iii) CDR-L3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 89-97 в SEQ ID NO: 70, или (II) его варианта, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67), и вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере

98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически узнает по меньшей мере часть эпитопа на человеческом MASP-2, узнаваемого эталонным антителом OMS646, содержащим вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 70.

ТМА вследствие трансплантации

Связанная с трансплантацией ТМА (ТА-ТМА) представляет собой разрушительный синдром, который может развиваться у получивших трансплантат пациентов, например, реципиентов трансплантата аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (смотри, например, Batts and Lazarus, Bone Marrow Transplantation 40:709-719, 2007). Патогенез этого состояния не до конца понятен, однако вероятно, включает совокупность ответов, которые приводят к повреждению эндотелиальных клеток (Laskin B.L. et al., Blood 118(6):1452-62, 2011). Как описано выше, повреждение эндотелиальных клеток является типичным стимулом для активации лектинового пути и создания протромботического состояния.

Последние данные дополнительно свидетельствуют в пользу активации комплемента через лектиновый путь в патогенезе ТА-ТМА. Laskin с соавторами продемонстрировали, что отложение C4d в артериолах почек чаще встречалось у субъектов с гистологическими признаками ТА-ТМА (75%), в сравнении с контрольными субъектами (8%) (Laskin B.L., et al., Transplantation, 27; 96(2):217-23, 2013). Таким образом, C4d может являться патологическим маркером ТА-ТМА, имеющим отношение к локализованной фиксации комплемента через лектиновый или классический путь.

Поскольку активация лектинового пути и создание протромботического состояния зависит от MASP-2, ожидается, что ингибиторы MASP-2, включая, но без ограничения, антитела, блокирующие функцию MASP-2, будут приводить к уменьшению ответа в виде ТМА и уменьшению риска развития связанной с трансплантатом ТМА (ТА-ТМА).

Соответственно, в другом варианте осуществления изобретение относится к способам лечения или предотвращения ТМА вследствие трансплантации путем введения композиции, содержащей терапевтически эффективное количество ингибирующего MASP-2 средства, такого как анти-MASP-2 антитело, в фармацевтическом носителе субъекту, страдающему от, или имеющему риск развития, ТМА вследствие

трансплантации. Ингибирующее MASP-2 средство вводят субъекту, который подвергался, подвергается, или будет подвергаться процедуре трансплантации, системно, например, внутриартериальным, внутривенным, внутримышечным, ингаляционным, назальным, подкожным или другим парентеральным путем введения, или, потенциально, пероральным путем введения в случае не пептидергических средств. Анти-MASP-2 антитело можно вводить отдельно или в сочетании с ингибитором C5, таким как экулизумаб. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения или предотвращения ТМА вследствие трансплантации аллогенных стволовых клеток, включающим введение композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 средства, такого как ингибирующее MASP-2 антитело, субъекту до, в процессе, или после получения трансплантата аллогенных стволовых клеток.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело имеет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческий MASP-2 с величиной K_D, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в домене CCP1 MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в in vitro анализе в 1% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее, при этом антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', $F(ab)_2$ и $F(ab')_2$, при этом антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG2, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, при этом молекула IgG4 имеет мутацию S228P, и/или при этом антитело существенно не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не ингибирует альтернативный путь. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не ингибирует классический путь или альтернативный путь (то есть, ингибирует лектиновый путь, при этом не затрагивая классический и альтернативный пути комплемента).

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке субъекта, страдающего от ТМА вследствие трансплантации, на по меньшей мере 30%, например, по меньшей мере 40%, например, по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80% например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% вплоть до 99% в сравнении с контрольной сывороткой.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке пациента, страдающего от ТМА вследствие трансплантации, на по меньшей мере 30%, например, по меньшей мере 40%, например, по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 70%,

например, по меньшей мере 80% например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% вплоть до 99% в сравнении с контрольной сывороткой.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту способом доставки через внутривенный катетер или другой катетер.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования образования тромбов у субъекта, страдающего от TMA вследствие трансплантации, включающему введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего (I) (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: i) CDR-H1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 31-35 в SEQ ID NO: 67; и ii) CDR-H2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-65 в SEQ ID NO: 67; и iii) CDR-H3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 95-102 в SEQ ID NO: 67, и b) вариабельную область легкой цепи, содержащую: i) CDR-L1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 24-34 в SEQ ID NO: 70; и ii) CDR-L2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-56 в SEQ ID NO: 70; и iii) CDR-L3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 89-97 в SEQ ID NO: 70, или (II) его варианта, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67), и вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически узнает по меньшей мере часть эпитопа на человеческом MASP-2, узнаваемого эталонным антителом OMS646, содержащим вариабельную область

тяжелой цепи с SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 70.

IV. Роль MASP-2 в других заболеваниях и состояниях, и способы лечения с использованием ингибирующих MASP-2 средств

Заболевания почек

Активация системы комплемента участвует в патогенезе различных заболеваний почек; включая мезангиопролиферативный гломерулонефрит (IgA-нефропатия, болезнь Бергера) (Endo, M., et al., Clin. Nephrology 55:185-191, 2001), мембранозный гломерулонефрит (Kerjashki, D., Arch B Cell Pathol. 58:253-71, 1990; Brenchley, P.E., et al., Kidney Int., 41:933-7, 1992; Salant, D.J., et al., Kidney Int. 35:976-84, 1989), мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит (мезангиокапиллярный гломерулонефрит) (Bartlow, B.G., et al., Kidney Int. 15:294-300, 1979; Meri, S., et al., J. Exp. Med. 175:939-50, 1992), острый постинфекционный гломерулонефрит (постстрептококковый гломерулонефрит), криоглобулинемический гломерулонефрит (Ohsawa, I., et al., Clin Immunol. 101:59-66, 2001), волчаночный нефрит (Gatenby, P.A., Autoimmunity 11:61-6, 1991) и нефрит на фоне пурпуры Геноха-Шенлейна (Endo, M., et al., Am. J. Kidney Dis. 35:401-407, 2000). Вовлечение комплемента в почечную недостаточность признавалось в течение нескольких десятилетий, однако все еще ведутся серьезные дискуссии о его точной роли на стадии возникновения, развития и разрешения почечной недостаточности. В нормальных условиях роль комплемента является полезной для хозяина, однако неадекватная активация и отложение комплемента могут приводить к повреждению тканей.

Существуют убедительные доказательства того, что гломерулонефрит, воспаление клубочков, часто инициируется отложением иммунных комплексов на структурах клубочков и канальцев, с последующим запуском активации комплемента, воспаления и повреждения тканей. Kahn и Sinniah продемонстрировали повышенное отложение C5b-9 в базальных мембранах канальцев в биопсийных образцах от пациентов с различными формами гломерулонефрита (Kahn, T.N., et al., Histopath. 26:351-6, 1995). В исследовании с участием пациентов с IgA-нефропатией (Alexopoulos, A., et al., Nephrol. Dial. Transplant 10:1166-1172, 1995) отложение C5b-9 в эпителиальных/базальных мембранных структурах клубочков коррелировало с уровнями креатинина в плазме. Другое исследование мембранозной нефропатии продемонстрировало связь между клиническим исходом и уровнями sC5b-9 в моче (Kon, S.P., et al., Kidney Int. 48:1953-58, 1995). Повышенные уровни sC5b-9 положительно коррелировали с неблагоприятным прогнозом. Lehto с соавторами определяли повышенные уровни CD59, регуляторного фактора комплемента, который ингибирует мембраноатакующий комплекс в плазматических мембранах, а также C5b-9 в моче пациентов с мембранозным гломерулонефритом (Lehto, T., et al., Kidney Int. 47:1403-11, 1995). Гистопатологический анализ биопсийных образцов от тех же пациентов показал наличие отложений белков C3 и C9 в клубочках, в то время как экспрессия CD59 в этих тканях была снижена в сравнении с таковой в нормальной почечной ткани. Результаты этих исследований указывают на то, что текущий опосредованный комплементом гломерулонефрит приводит к выведению с мочой белков комплемента,

которое коррелирует со степенью повреждения тканей и прогнозом заболевания.

Ингибирование активации комплемента в различных животных моделях гломерулонефрита также продемонстрировало важность активации комплемента в этиологии заболевания. В модели мембранозно-пролиферативного гломерулонефрита (MPGN) инфузия анти-Thy1 сыворотки крысам с дефицитом C6 (у которых не образуется C5b-9) приводит к уменьшению на 90% пролиферации клеток клубочков, уменьшению на 80% инфильтрации тромбоцитов и макрофагов, уменьшению синтеза коллагена IV типа (маркера увеличения объема мезангиального матрикса) и уменьшению на 50% протеинурии, в сравнении с C6+ нормальными крысами (Brandt, J., et al., Kidney Int. 49:335-343, 1996). Эти результаты предполагают, что C5b-9 является основным медиатором повреждения ткани комплементом в этой модели на крысах с сывороткой против тимоцитов. В другой модели гломерулонефрита инфузия градуированных доз антител кролика против базальной мембраны клубочков крыс приводила к зависимому от дозы притоку полиморфноядерных лейкоцитов (PMN), который был ослаблен за счет предварительной обработки фактором яда кобры (для уничтожения комплемента) (Scandrett, A.L., et al., Am. J. Physiol. 268:F256-F265, 1995). У крыс, которым вводили фактор яда кобры, также наблюдали менее выраженную гистопатологию, менее выраженную долгосрочную протеинурию и более низкие уровни креатинина, чем у контрольных крыс. Используя три модели GN у крыс (сыворотку против тимоцитов, Con A анти-Con A и пассивный нефрит Хеймана), Couser с соавторами продемонстрировали потенциальную терапевтическую эффективность подходов к ингибированию комплемента с использованием рекомбинантного белка sCR1 (Couser, W.G., et al., J. Am. Soc. Nephrol. 5:1888-94, 1995). У крыс, получавших sCR1, наблюдали значительно меньший приток PMN, тромбоцитов и макрофагов, уменьшение мезангиолиза и протеинурии в сравнении с контрольными крысами. Дополнительное свидетельство в пользу важности активации комплемента при гломерулонефрите было получено с использованием анти-C5 моАт в модели на мышах NZB/W F1. Анти-C5 моАт ингибирует расщепление C5, таким образом блокируя образование C5a и C5b-9. Постоянное введение анти-C5 моАт в течение 6 месяцев приводило к значительному облегчению протекания гломерулонефрита. Гуманизированное анти-C5 моноклональное антитело моАт (5G1.1), которое предотвращает расщепление человеческого компонента C5 комплемента на его провоспалительные компоненты, разрабатывается компанией Alexion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut, в качестве потенциального терапевтического средства для лечения гломерулонефрита.

Прямое доказательство патологической роли комплемента в повреждении почек было получено при изучении пациентов с генетическим дефицитом конкретных компонентов комплемента. В ряде отчетов была задокументирована связь почечной недостаточности с дефицитом регуляторного фактора H комплемента (Ault, B.H., Nephrol. 14:1045-1053, 2000; Levy, M., et al., Kidney Int. 30:949-56, 1986; Pickering, M.C., et al., Nat. Genet. 31:424-8, 2002). Дефицит фактора H приводит к низким уровням в плазме факторов

B и C3 и поглощению C5b-9. Как атипичный мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит (MPGN), так и идиопатический гемолитический уремический синдром (HUS), связаны с дефицитом фактора H. Свиньи с дефицитом фактора H (Jansen, J.H., et al., Kidney Int. 53:331-49, 1998) и мыши с нокаутом фактора H (Pickering, M.C., 2002) проявляют MPGN-подобные симптомы, что подтверждает важность фактора H в регуляции комплемента. Дефициты других компонентов комплемента связаны с почечной недостаточностью, возникающей вследствие системной красной волчанки (SLE) (Walport, M.J., Davies, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 815:267-81, 1997). Дефицит C1q, C4 и C2 является сильным фактором предрасположенности к развитию SLE по механизмам, связанным с нарушением клиренса иммунных комплексов и апоптотического материала. У многих из этих пациентов с SLE развивается волчаночный нефрит, характеризующийся отложением иммунных комплексов во всей клубочковой зоне.

Дополнительные доказательства связи активации комплемента с почечной недостаточностью были получены при обнаружении у пациентов аутоантител, направленных против компонентов комплемента, некоторые из которых были непосредственно связаны с почечной недостаточностью (Trouw, L.A., et al., Mol. Immunol. 38:199-206, 2001). Многие из таких аутоантител демонстрируют настолько высокую степень корреляции с почечной недостаточностью, что для определения этой активности был принят термин «нефритный фактор» (NeF). В клинических испытаниях у примерно 50% пациентов с положительными результатами анализа на нефритный фактор развивался MPGN (Spitzer, R.E., et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 64:177-83, 1992). C3NeF представляет собой аутоантитело, направленное против C3-конвертазы альтернативного пути (C3bBb), и оно стабилизирует эту конвертазу, тем самым стимулируя активацию альтернативного пути (Daha, M.R., et al., J. Immunol. 116:1-7, 1976). Аналогично, аутоантитело со специфичностью для C3-конвертазы классического пути (C4b2a), называемое C4NeF, стабилизирует эту конвертазу и, тем самым, стимулирует активацию классического пути (Daha, M.R. et al., J. Immunol. 125:2051-2054, 1980; Halbwachs, L., et al., J. Clin. Invest. 65:1249-56, 1980). Показано, что анти-C1q аутоантитела связаны с нефритом у пациентов с SLE (Hovath, L., et al., Clin. Exp. Rheumatol. 19:667-72, 2001; Siegert, C., et al., J. Rheumatol. 18:230-34, 1991; Siegert, C., et al., Clin. Exp. Rheumatol. 10:19-23, 1992), и сообщалось о том, что возрастание титра этих анти-C1q аутоантител позволяет прогнозировать вспышку нефрита (Coremans, I.E., et al., Am. J. Kidney Dis. 26:595-601, 1995). Отложения иммунных комплексов, посмертно элюированные с почек пациентов с SLE, выявили накопления этих анти-C1q аутоантител (Mannick, M., et al., Arthritis Rheumatol. 40:1504-11, 1997). Все эти факты указывают на патологическую роль этих аутоантител. Однако не у всех пациентов с анти-C1q аутоантителами развивается почечная недостаточность и, кроме того, некоторые здоровые индивидуумы имеют низкие титры таких анти-C1q аутоантител (Siegert, C.E., et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 67:204-9, 1993).

Помимо альтернативного и классического путей активации комплемента,

лектиновый путь также может играть важную патологическую роль в развитии почечной недостаточности. Повышенные уровни MBL, MBL-ассоциированной сериновой протеазы и продуктов активации комплемента были обнаружены иммуногистохимическими методами в биопсийном материале почек, полученном от пациентов с диагностированными несколькими разными заболеваниями почек, включая нефрит на фоне пурпуры Геноха-Шенлейна (Endo, M., et al., Am. J. Kidney Dis. 35:401-407, 2000), криоглобулинемический гломерулонефрит (Ohsawa, I., et al., Clin. Immunol. 101:59-66, 2001) и IgA-невропатию (Endo, M., et al., Clin. Nephrology 55:185-191, 2001). Таким образом, несмотря на тот факт, что связь между комплементом и заболеваниями почек была известна в течение нескольких десятилетий, данные о том, как именно комплемент влияет на эти заболевания почек, являются далеко не полными.

Заболевания крови

Сепсис вызывается генерализованной реакцией пациента на проникающие в тело микроорганизмы. Основная функция системы комплемента заключается в организации воспалительного ответа на вторгающиеся бактерии и другие патогены. В соответствии с этой физиологической ролью, активация комплемента, как показано в многочисленных исследованиях, играет основную роль в патогенезе сепсиса (Bone, R.C., Annals. Internal. Med. 115:457-469, 1991). Определение клинических проявлений сепсиса постоянно развивается. Сепсис обычно определяют как системный ответ хозяина на инфекцию. Однако во многих случаях клинические доказательства инфекции (например, положительные результаты посева крови на наличие бактерий) отсутствуют у пациентов с симптомами сепсиса. Это несоответствие впервые было учтено на консенсусной конференции в 1992 г., когда был принят термин «синдром системного воспалительного ответа» (SIRS), для которого не требовалось наличие поддающейся определению бактериальной инфекции (Bone, R.C., et al., Crit. Care Med. 20:724-726, 1992). В настоящее время существует общее мнение, что сепсис и SIRS связаны с неспособностью к регуляции воспалительного ответа. Для целей этого краткого обзора авторы изобретения будут считать, что клиническое определение сепсиса также включает тяжелый сепсис, септический шок и SIRS.

Преобладающим источником инфекции у пациентов с сепсисом до конца 1980-х годов были грамотрицательные бактерии. Известно, что липополисахарид (LPS), основной компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий, стимулирует высвобождение медиаторов воспалительного ответа из клеток разных типов и вызывает симптомы острой инфекции при введении инъекцией животным (Haeney, M.R., et al., Antimicrobial Chemotherapy 41(Suppl. A):41-6, 1998). Интересно, что спектр ответственных микроорганизмов, судя по всему, сместился от преимущественно грамотрицательных бактерий в конце 1970-х и 1980-х годов к преимущественно грамположительным бактериям в настоящее время, по причинам, которые до сегодняшнего дня остаются неясными (Martin, G.S., et al., N. Eng. J. Med. 348:1546-54, 2003).

Результаты многих исследований демонстрируют важность активации

комплемента в медиации воспаления и в развитии признаков шока, в частности, септического и геморрагического шока. Обычно септический шок вызывают как грамотрицательные, так и грамположительные, микроорганизмы. LPS является сильным активатором комплемента, преимущественно через альтернативный путь, хотя также имеет место активация через классический путь, опосредованная антителами (Fearon, D.T., et al., N. Engl. J. Med. 292:937-400, 1975). Основными компонентами клеточной стенки грамположительных бактерий являются пептидогликан и липотейхоевая кислота, и оба компонента являются сильными активаторами альтернативного пути комплемента, хотя в присутствии специфических антител они также могут активировать классический путь комплемента (Joiner, K.A., et al., Ann. Rev. Immunol. 2:461-2, 1984).

Исходно предположение об участии системы комплемента в патогенезе сепсиса было высказано, когда исследовали заметили, что анафилатоксины C3a и C5a опосредуют различные воспалительные реакции, которые также могут иметь место при сепсисе. Эти анафилатоксины вызывают расширение сосудов и увеличение проницаемости микрососудов, явления, которые играют центральную роль при септическом шоке (Schumacher, W.A., et al., Agents Actions 34:345-349, 1991). Кроме того, анафилатоксины вызывают бронхоспазм, высвобождение гистамина из тучных клеток и агрегацию тромбоцитов. Кроме того, они оказывают многочисленные эффекты на гранулоциты, например, хемотаксис, агрегацию, адгезию, высвобождение лизосомальных ферментов, образование токсического супероксидного аниона и образование лейкотриенов (Shin, H.S., et al., Science 162:361-363, 1968; Vogt, W., Complement 3:177-86, 1986). Считают, что эти биологические эффекты играют роль в развитии осложнений сепсиса, таких как шок или острый респираторный дистресс-синдром (ARDS) (Hammerschmidt, D.E., et al., Lancet 1:947-949, 1980; Slotman, G.T., et al., Surgery 99:744-50, 1986). Кроме того, повышенные уровни анафилатоксина C3a связаны со смертельным исходом при сепсисе (Hack, C.E., et al., Am. J. Med. 86:20-26, 1989). В некоторых животных моделях шока определенные линии животных с дефицитом компонентов комплемента (например, с дефицитом C5) являются более устойчивыми к эффектам инфузии LPS (Hseuh, W., et al., Immunol. 70:309-14, 1990).

Показано, что блокирование антителами образования C5a в начале развития сепсиса у грызунов сильно увеличивает показатели выживаемости (Czermak, B.J., et al., Nat. Med. 5:788-792, 1999). Аналогичные результаты были получены при блокировании рецептора C5a (C5aR) либо антителами, либо низкомолекулярным ингибитором (Huber-Lang, M.S., et al., FASEB J. 16:1567-74, 2002; Riedemann, N.C., et al., J. Clin. Invest. 110:101-8, 2002). Результаты ранних экспериментальных исследований на обезьянах указывали на то, что блокирование антителами C5a облегчало вызываемый E. coli септический шок и респираторный дистресс-синдром взрослых (Hangen, D.H., et al., J. Surg. Res. 46:195-9, 1989; Stevens, J.H., et al., J. Clin. Invest. 77:1812-16, 1986). У людей с сепсисом уровень C5a бывает повышен и связан со значительно сниженными показателями выживаемости, в сочетании с полиорганной недостаточностью, в сравнении с уровнем у пациентов с менее

тяжелым сепсисом и у выживших пациентов (Nakae, H., et al., Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 84:189-95, 1994; Nakae, et al., Surg. Today 26:225-29, 1996; Bengtson, A., et al., Arch. Surg. 123:645-649, 1988). Механизмы, за счет которых C5a оказывает свое вредное действие при сепсисе, еще предстоит подробно изучать, однако последние данные указывают на то, что образование C5a при сепсисе значительно ослабляет врожденные иммунные функции нейтрофилов крови (Huber-Lang, M.S., et al., J. Immunol. 169:3223-31, 2002), их способность осуществлять респираторный взрыв и их способность вырабатывать цитокины (Riedemann, N.C., et al., Immunity 19:193-202, 2003). Кроме того, образование C5a при сепсисе, судя по всему, оказывает прокоагулянтные эффекты (Laudes, I.J., et al., Am. J. Pathol. 160:1867-75, 2002). Комплемент-модулирующий белок CI INH также проявлял эффективность в животных моделях сепсиса и ARDS (Dickneite, G., Behring Ins. Mitt. 93:299-305, 1993).

Лектиновый путь также может играть определенную роль в патогенезе сепсиса. Показано, что MBL связывает целый ряд клинически важных микроорганизмов, включая грамотрицательные и грамположительные бактерии, и активирует лектиновый путь (Neth, O., et al., Infect. Immun. 68:688, 2000). Липотейхоевая кислота (LTA) все больше признается в качестве аналога LPS у грамположительных бактерий. Она является сильным иммуностимулятором, индуцирующим высвобождение цитокинов из мононуклеарных фагоцитов и цельной крови (Morath, S., et al., J. Exp. Med. 195:1635, 2002; Morath, S., et al., Infect. Immun. 70:938, 2002). Недавно было показано, что L-фиколин специфически связывает LTA, выделенную из разных видов грамположительных бактерий, включая Staphylococcus aureus, и активирует лектиновый путь (Lynch, N.J., et al., J. Immunol. 172:1198-02, 2004). Также показано, что MBL связывает LTA из Enterococcus spp., в которой полиглицерофосфатная цепь замещена гликозильными группами, но не LTA из девяти других видов, включая S. aureus (Polotsky, V.Y., et al., Infect. Immun. 64:380, 1996).

Таким образом, один из аспектов изобретения относится к способу лечения сепсиса, или состояния, связанного с сепсисом, путем введения композиции, содержащей терапевтически эффективное количество ингибирующего MASP-2 средства в фармацевтическом носителе субъекту, страдающему от сепсиса, или состояния, связанного с сепсисом, включая, без ограничения, тяжелый сепсис, септический шок, острый респираторный дистресс-синдром, возникающий вследствие сепсиса, и синдром системного воспалительного ответа. Связанные способы предложены для лечения других заболеваний крови, включая геморрагический шок, гемолитическую анемию, аутоиммунную тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (TTP), гемолитический уремический синдром (HUS), атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS) или другие разрушительные состояния костного мозга/крови, путем введения композиции, содержащей терапевтически эффективное количество ингибирующего MASP-2 средства в фармацевтическом носителе субъекту, страдающему от такого состояния. Ингибирующее MASP-2 средство вводят субъекту системно, например, внутриартериальным, внутривенным, внутримышечным, ингаляционным (особенно в

случае ARDS), подкожным или другим парентеральным путем введения, или, потенциально, пероральным путем введения в случае не пептидергических средств. Композицию ингибирующего MASP-2 средства можно объединять с одним или более дополнительными терапевтическими средствами для борьбы с последствиями сепсиса и/или шока. При прогрессирующем сепсисе или шоке, или состоянии дистресса, связанном с ним, ингибирующую MASP-2 композицию, предпочтительно, можно вводить в быстродействующей лекарственной форме, например, путем болюсной внутривенной или внутриартериальной доставки раствора, содержащего композицию ингибирующего MASP-2 средства. Повторное введение можно осуществлять по решению врача, до устранения этого состояния.

Коагулопатии

Было получено доказательство роли системы комплемента в развитии диссеминированной внутрисосудистой коагуляции («DIC»), такой как DIC вследствие обширной травмы тела.

В предыдущих исследованиях было показано, что мыши C4-/- не защищены от реперфузионного повреждения почек. (Zhou, W., et al, «Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury» J Clin Invest 105:1363-1371 (2000)). Для изучения того, может ли у мышей C4-/- все еще активироваться комплемент через классический или лектиновый путь, был определен оборот C3 в плазме животных C4-/- в анализах, специфических для активации либо классического, либо лектинового пути. Хотя расщепление C3 отсутствовало при инициации активации через классический путь, наблюдали высокоэффективную зависимую от лектинового пути активацию C3 в дефицитной по C4 сыворотке (ФИГУРА 30). Можно видеть, что отложение C3b на маннане и зимозане сильно нарушено у мышей MASP-2-/-, даже в экспериментальных условиях, что в соответствии с многими ранее опубликованными работами по активации альтернативного пути, должно быть разрешающим для всех трех путей. При использовании той же сыворотки в лунках, покрытых иммуноглобулиновыми комплексами вместо маннана или зимозана, отложение C3b и расщепление фактора B наблюдали в мышиной сыворотке MASP-2+/+ и сыворотке MASP-2-/-, но не в истощенной по C1q сыворотке. Это указывает на то, что активация альтернативного пути упрощается в сыворотке MASP-2-/-, когда начальный C3b обеспечен за счет активности классического пути. На ФИГУРЕ 30C представлен тот удивительный результат, что C3 может быть эффективно активирован зависимым от лектинового пути образом в дефицитной по C4 плазме.

Этот «обход C4» ликвидируется при ингибировании активации лектинового пути за счет преинкубации плазмы с растворимыми маннаном или маннозой.

Аберрантная, не иммунная, активация системы комплемента является потенциально опасной для человека и также может играть важную роль в активации гематологического пути, в частности, в случаях тяжелой травмы, когда активированы и воспалительный, и гематологический, пути. В норме результатом конверсии C3 является

<5% суммарного белка C3 в плазме. При сильной инфекции, включая септицемию и болезнь иммунных комплексов, конверсия C3 возрастает до уровня примерно 30%, часто с уровнями комплемента ниже нормальных уровней, вследствие повышенной утилизации и изменений в распределении пула. Прямая активация пути C3 до уровня более 30%, как правило, приводит к явным клиническим проявлениям расширения сосудов и утечки жидкости в ткани. При конверсии C3 выше 30% инициирующие механизмы преимущественно являются не иммунными, и возникающие клинические проявления являются вредными для пациента. Уровни C5 комплемента в здоровом состоянии и при контролируемом заболевании кажутся намного более стабильными, чем уровни C3. Значительное уменьшение и/или изменение уровней C5 связано с ответом пациента на аномальную политравму (например, при дорожно-транспортном происшествии), и возможно развитие синдромов «шокового» легкого. Таким образом, любое свидетельство активации C3 комплемента на уровне выше 30% сосудистого пула, или любого вовлечения C5, либо и того, и другого, можно считать вероятным предвестником вредных патологических изменений в организме пациента.

Как C3, так и C5, высвобождают анафилатоксины (C3a и C5a), которые действуют на тучные клетки и базофилы, приводя к высвобождению сосудорасширяющих химических веществ. Они создают градиенты для хемотаксиса, которые направляют полиморфноядерные клетки (PMN) в центр иммунологических нарушений (полезный ответ), но здесь они отличаются, поскольку C5a имеет специфический агглютинирующий (агрегирующий) эффект на эти фагоцитирующие клетки, предотвращающий их случайное удаление от участка реакции. При нормальном контроле инфекции C3 активирует C5. Однако при политравме C5, судя по всему, масштабно активируется, системно генерируя анафилатоксины C5a. Эта неконтролируемая активность вызывает агглютинацию полиморфных форм в сосудистой системе, и эти комки затем смываются в капилляры легких, где они вызывают окклюзию и оказывают локальное повреждающее действие за счет высвобождения супероксида. Без связи с конкретной теорией, данный механизм возможно важен в патогенезе острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), хотя эта точка зрения недавно была подвергнута сомнению. Анафилатоксины C3a in vitro могут демонстрировать сильные агрегирующие свойства в отношении тромбоцитов, однако их участие in vivo менее понятно, и высвобождение веществ тромбоцитов и плазмина при заживлении раны может лишь вторично включать C3 комплемента. Возможно, что продолжительное повышение уровня активации C3 необходимо для возникновения DIC.

Помимо клеточных и сосудистых эффектов активированных компонентов комплемента, описанных выше, которые могли бы объяснить связь между травмой и DIC, появляющиеся научные результаты выявили прямые молекулярные связи и функциональную взаимосвязь между системами комплемента и коагуляции. Подтверждающие данные были получены в исследованиях на мышах с дефицитом C3. Поскольку C3 является общим компонентом всех путей комплемента, ожидается, что мыши с дефицитом C3 будут лишены всех функций комплемента. Удивительно, но у

мышей с дефицитом C3 могут полностью активироваться терминальные компоненты комплемента. (Huber-Lang, M., et al., «Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway», Nat. Med 12:682-687 (2006)). Углубленные исследования показали, что C3-независимая активация терминальных компонентов комплемента опосредуется тромбином, скорость-лимитирующим ферментом каскада коагуляции. (Huber et al., 2006). Молекулярные компоненты, опосредующие активацию тромбина после начальной активации комплемента, остаются неясными.

Авторы настоящего изобретения выяснили то, что считают молекулярной основой взаимосвязи между комплементом и каскадом коагуляции, и идентифицировали MASP-2 как центральную контрольную точку, связывающую две системы. Биохимические исследования субстратной специфичности MASP-2 выявили протромбин в качестве возможного субстрата, в дополнение к хорошо известным белкам C2 и C4 комплемента. MASP-2 специфически расщепляет протромбин в функционально важных сайтах, с образованием тромбина, скорость-лимитирующего фермента каскада коагуляции. (Krarup, A., et al., «Simultaneous Activation of Complement and Coagulation by MBL-Associated Serine Protease 2», PLoS. ONE. 2:e623 (2007)). Созданный за счет MASP-2 тромбин способен стимулировать отложение фибрина в определенной восстановленной in vitro системе, что демонстрирует функциональную важность расщепления за счет MASP-2. (Krarup et al., 2007). Как описано в примерах, приведенных ниже в настоящем документе, авторы изобретения дополнительно подтвердили физиологическую важность этого открытия, документируя активацию тромбина в нормальной сыворотке грызунов после активации лектинового пути, и продемонстрировали, что этот процесс блокируется нейтрализующими MASP-2 моноклональными антителами.

MASP-2 может представлять собой центральную точку ветвления в лектиновом пути, способную стимулировать активацию как системы комплемента, так и системы коагуляции. Поскольку активация лектинового пути является физиологическим ответом на многие виды травматического повреждения, авторы настоящего изобретения считают, что происходящие одновременно системное воспаление (опосредованное компонентами комплемента) и диссеминированную коагуляцию (опосредованную путем коагуляции) можно объяснить способностью MASP-2 активировать оба пути. Эти результаты отчетливо свидетельствуют о роли MASP-2 в возникновении DIC и терапевтической пользе ингибирования MASP-2 при лечении или предотвращении DIC. MASP-2 может обеспечивать молекулярную связь между системами комплемента и коагуляции, и активация лектинового пути, имеющая место в условиях травмы, может непосредственно инициировать активацию системы коагуляции через ось MASP-2-тромбин, обеспечивая механистическую связь между травмой и DIC. В соответствии с одним из аспектов настоящего изобретения ингибирование MASP-2 привело бы к ингибированию активации лектинового пути и уменьшению образования обоих анафилатоксинов, C3a и C5a. Считается, что продолжительное повышение уровня активации C3 необходимо для возникновения DIC.

Микрососудистая коагуляция (сгустки крови в капиллярах и мелких кровеносных сосудах) происходит в таких ситуациях, как септический шок. Роль лектинового пути при септическом шоке установлена, о чем свидетельствует защитный фенотип MASP-2 (-/-) в мышиных моделях сепсиса, как описано в примере 17 и на ФИГУРАХ 18 и 19. Кроме того, как продемонстрировано в примере 15 и на ФИГУРАХ 16A и 16B, мыши MASP-2 (-/-) защищены в условиях локализованной реакции Шварцмана, модели диссеминированной внутрисосудистой коагуляции (DIC) и модели локализованной коагуляции в микрососудах.

V. Ингибирующие MASP-2 средства

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента у субъекта, страдающего от, или имеющего риск развития, тромботической микроангиопатии. Ингибирующие MASP-2 средства вводят в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента у субъекта. При осуществлении на практике изобретения репрезентативные ингибирующие MASP-2 средства включают: молекулы, которые ингибируют биологическую активность MASP-2 (такие как низкомолекулярные ингибиторы, анти-MASP-2 антитела или блокирующие пептиды, которые взаимодействуют с MASP-2 или препятствуют белок-белковым взаимодействиям), и молекулы, которые уменьшают экспрессию MASP-2 (такие как антисмысловые молекулы нуклеиновой кислоты MASP-2, специфические для MASP-2 молекулы РНКи и рибозимы MASP-2), эти молекулы предотвращают активацию лектинового путь комплемента за счет MASP-2. Ингибирующие MASP-2 средства можно использовать отдельно в качестве основной терапии или в сочетании с другими терапевтическими средствами в качестве адъювантной терапии для усиления терапевтической пользы от лечения другими препаратами.

Ингибирование MASP-2-зависимой активации комплемента характеризуется по меньшей мере одним из следующих изменений в компонентах системы комплемента, которые происходят в результате введения ингибирующего MASP-2 средства в соответствии со способами по изобретению: ингибирование образования или продуцирования продуктов MASP-2-зависимой активации комплемента, C4b, C3a, C5a и/или C5b-9 (MAC) (измеряемое, например, как описано в примере 2), уменьшение активации комплемента при оценке в анализе гемолиза с использованием не сенсибилизированных эритроцитов кролика или морской свинки (измеряемое, например, как описано в примере 33), уменьшение расщепления C4 и отложения C4b (измеряемое, например, как описано в примере 2) или уменьшение расщепления C3 и отложения C3b (измеряемое, например, как описано в примере 2).

В соответствии с настоящим изобретением используют ингибирующие MASP-2 средства, которые эффективны для ингибирования MASP-2-зависимой системы активации комплемента. Ингибирующие MASP-2 средства, полезные при осуществлении на практике данного аспекта изобретения, включают, например, анти-MASP-2 антитела и их фрагменты, ингибирующие MASP-2 пептиды, малые молекулы, растворимые рецепторы

MASP-2 и ингибиторы экспрессии MASP-2. Ингибирующие MASP-2 средства могут ингибировать MASP-2-зависимую систему активации комплемента путем блокирования биологической функции MASP-2. Например, ингибирующее средство может эффективно блокировать белок-белковые взаимодействия MASP-2, препятствовать димеризации или сборке MASP-2, блокировать связывание Ca^{2+}, блокировать активный центр сериновой протеазы MASP-2, или могут вызывать уменьшение экспрессии белка MASP-2.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 средства избирательно ингибируют MASP-2-зависимую активацию комплемента, при этом не затрагивая функционально C1q-зависимую систему активации комплемента.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 средство, полезное в способах по изобретению, представляет собой специфическое ингибирующее MASP-2 средство, которое специфически связывает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6, с аффинностью, по меньшей мере в десять раз большей, чем аффинность для других антигенов в системе комплемента. В другом варианте осуществления ингибирующее MASP-2 средство специфически связывает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6, с аффинностью связывания, по меньшей мере в 100 раз большей, чем аффинность для других антигенов в системе комплемента. Аффинность связывания для ингибирующего MASP-2 средства можно определять с использованием соответствующего анализа связывания.

Полипептид MASP-2 имеет молекулярную структуру, аналогичную структуре MASP-1, MASP-3, C1r и C1s, протеаз C1 системы комплемента. Молекула кДНК с последовательностью SEQ ID NO: 4 кодирует репрезентативный пример MASP-2 (состоящего из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 5) и обеспечивает продуцирование человеческого полипептида MASP-2 с последовательностью лидера (ак 1-15), которая отщепляется после секреции, с образованием зрелой формы человеческого MASP-2 (SEQ ID NO: 6). Как показано на ФИГУРЕ 2, ген человеческого MASP-2 содержит двенадцать экзонов. кДНК человеческого MASP-2 закодирована экзонами B, C, D, F, G, H, I, J, K и L. Альтернативный сплайсинг приводит к образованию 20 кДа белка, называемого MBL-ассоциированным белком 19 («MAp19», иное название «sMAP») (SEQ ID NO: 2), закодированного (SEQ ID NO: 1), происходящего из экзонов B, C, D и E, как показано на ФИГУРЕ 2. Молекула кДНК с последовательностью SEQ ID NO: 50 кодирует мышиный MASP-2 (состоящий из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 51) и обеспечивает продуцирование полипептида мышиного MASP-2 с последовательностью лидера, которая отщепляется после секреции, с образованием зрелой формы мышиного MASP-2 (SEQ ID NO: 52). Молекула кДНК с последовательностью SEQ ID NO: 53 кодирует крысиный MASP-2 (состоящий из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 54) и обеспечивает продуцирование полипептида крысиного MASP-2 с последовательностью лидера, которая отщепляется после секреции, с образованием зрелой формы крысиного MASP-2 (SEQ ID

NO: 55).

Специалисты в данной области понимают, что последовательности, раскрытые в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 53, представляют собой отдельные аллели человеческого, мышиного и крысиного MASP-2, соответственно, и что предусмотрена возможность аллельных вариаций и альтернативного сплайсинга. Аллельные варианты нуклеотидных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 53, включая варианты, содержащие молчащие мутации, и варианты, в которых мутации приводят к изменениям аминокислотной последовательности, входят в объем настоящего изобретения. Аллельные варианты последовательности MASP-2 могут быть клонированы путем исследования кДНК или геномных библиотек от разных индивидуумов стандартными методами.

Домены человеческого белка MASP-2 (SEQ ID NO: 6) показаны на ФИГУРАХ 1 и 2A, и включают N-концевой домен C1r/C1s/VEGF морского ежа/костного морфогенетического белка (CUBI) (ак 1-121 в SEQ ID NO: 6), подобный эпидермальному фактору роста домен (ак 122-166), второй домен CUBI (ак 167-293), а также тандем доменов контрольного белка комплемента и домен сериновой протеазы. Альтернативный сплайсинг гена MASP-2 приводит к образованию MAp19, показанного на ФИГУРЕ 1. MAp19 представляет собой не ферментативный белок, содержащий N-концевую область CUB1-EGF из MASP-2 с четырьмя дополнительными остатками (EQSL), происходящими из экзона E, как показано на ФИГУРЕ 1.

Некоторые белки, как показано, связываются, или взаимодействуют, с MASP-2 путем белок-белковых взаимодействий. Например, известно, что MASP-2 связывается и образует Ca^{2+}-зависимые комплексы с лектиновыми белками MBL, H-фиколином и L-фиколином. Каждый комплекс MASP-2/лектин, как показано, активирует комплемент путем MASP-2-зависимого расщепления белков C4 и C2 (Ikeda, K., et al., J. Biol. Chem. 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M., et al., J. Exp. Med. 176:1497-2284, 2000; Matsushita, M., et al., J. Immunol. 168:3502-3506, 2002). Результаты исследований показали, что домены CUB1-EGF в MASP-2 необходимы для связи MASP-2 с MBL (Thielens, N.M., et al., J. Immunol. 166:5068, 2001). Также было показано, что домены CUB1EGFCUBII опосредуют димеризацию MASP-2, которая необходима для образования активного комплекса MBL (Wallis, R., et al., J. Biol. Chem. 275:30962-30969, 2000). Таким образом, могут быть идентифицированы ингибирующие MASP-2 средства, которые связывают или блокируют целевые области MASP-2, которые, как известно, важны для MASP-2-зависимой активации комплемента.

Анти-MASP-2 антитела

В некоторых вариантах осуществления данного аспекта изобретения ингибирующее MASP-2 средство представляет собой анти-MASP-2 антитело, которое ингибирует MASP-2-зависимую систему активации комплемента. Анти-MASP-2 антитела, полезные для данного аспекта изобретения, включают поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела, полученные от любого продуцирующего антитела

млекопитающего, и могут представлять собой мультиспецифические, химерные, гуманизированные, антиидиотипические антитела, а также фрагменты антител. Фрагменты антител включают фрагменты Fab, Fab', $F(ab)_2$, $F(ab')_2$, Fv, фрагменты scFv и одноцепочечные антитела, описанные далее в настоящем документе.

Несколько анти-MASP-2 антител были описаны в литературе, некоторые из них перечислены ниже в ТАБЛИЦЕ 1. Эти ранее описанные анти-MASP-2 антитела можно подвергать скринингу на способность к ингибированию MASP-2-зависимой системы активации комплемента с использованием анализов, описанных в настоящем документе. Например, были идентифицированы Fab2 антитела против крысиного MASP-2, которые блокируют MASP-2-зависимую активацию комплемента, как описано более подробно в настоящем документе в примерах 10 и 11. После идентификации анти-MASP-2 антитела, которое действует в качестве ингибирующего MASP-2 средства, его можно использовать для получения антиидиотипических антител, а также использовать для идентификации других связывающих MASP-2 молекул, как дополнительно описано ниже.

ТАБЛИЦА 1: MASP-2-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, ОПИСАННЫЕ В ЛИТЕРАТУРЕ

АНТИГЕН	ТИП АНТИТЕЛА	ССЫЛКА
Рекомбинантный MASP-2	Поликлональное крысиное	Peterson, S.V., et al., Mol. Immunol. 37:803-811, 2000
Рекомбинантный человеческий фрагмент CCP1/2-SP (моАт 8B5)	Крысиное моАт (подкласс IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., J. of Immunol. Methods 282:159-167, 2003
Рекомбинантный человеческий MAp19 (моАт 6G12) (перекрестно реагирует с MASP-2)	Крысиное моАт (подкласс IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., J. of Immunol. Methods 282:159-167, 2003
hMASP-2	Мышиное моАт (S/P) Мышиное моАт (N-конец)	Peterson, S.V., et al., Mol. Immunol. 35:409, April 1998
hMASP-2 (домен CCP1-CCP2-SP)	Крысиное моАт: Nimoab101, продуцируемое линией клеток гибридомы 03050904 (ECACC)	WO 2004/106384

hMASP-2 (полноразмерный с his-меткой)	Мышиные моАт: NimoAb104, продуцируемое линией клеток гибридомы M0545YM035 (DSMZ) NimoAb108, продуцируемое линией клеток гибридомы M0545YM029 (DSMZ) NimoAb109, продуцируемое линией клеток гибридомы M0545YM046 (DSMZ) NimoAb110, продуцируемое линией клеток гибридомы M0545YM048 (DSMZ)	WO 2004/106384

*Анти-*MASP*-2 антитела с редуцированной эффекторной функцией*

В некоторых вариантах осуществления данного аспекта изобретения анти-MASP-2 антитела имеют редуцированную эффекторную функцию для уменьшения воспаления, которое может возникать вследствие активации классического пути комплемента. Способность молекул IgG запускать классический путь комплемента, как было продемонстрировано, связана с Fc-частью молекулы (Duncan, A.R., et al., Nature 332:738-740 1988). Молекулы IgG, в которых Fc-часть молекулы была удалена путем ферментативного расщепления, лишены этой эффекторной функции (смотри Harlow, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988). Соответственно, могут быть получены антитела с редуцированной эффекторной функцией вследствие отсутствия Fc-части молекулы путем создания генетически

модифицированной последовательности Fc, которая имеет минимальную эффекторную функцию, или относится к изотипу IgG2 или IgG4 антител человека.

Антитела с редуцированной эффекторной функцией могут быть получены путем стандартных молекулярно-биологических манипуляций с Fc-частью тяжелых цепей IgG, как описано в настоящем документе в Примере 9, и также описано в публикациях Jolliffe et al., Int'l Rev. Immunol. 10:241-250, 1993, и Rodrigues et al., J. Immunol. 151:6954-6961, 1998. Антитела с редуцированной эффекторной функцией также включают человеческие антитела изотипов IgG2 и IgG4, которые имеют редуцированную способность активировать комплемент и/или взаимодействовать с Fc-рецепторами (Ravetch, J.V., et al., Annu. Rev. Immunol. 9:457-492, 1991; Isaacs, J.D., et al., J. Immunol. 148:3062-3071, 1992; van de Winkel, J.G., et al., Immunol. Today 14:215-221, 1993). Гуманизированные или полностью человеческие антитела, специфические для человеческого MASP-2, изотипов IgG2 или IgG4 могут быть получены одним из ряда способов, известных специалисту в данной области, как описано в Vaughan, T.J., et al., Nature Biotechnical 16:535-539, 1998.

*Получение анти-*MASP*-2 антител*

Анти-MASP-2 антитела могут быть получены с использованием полипептидов MASP-2 (например, полноразмерного MASP-2) или с использованием антигенных пептидов, несущих эпитоп MASP-2 (например, части полипептида MASP-2). Иммуногенные пептиды могут иметь длину не более пяти аминокислотных остатков. Например, полипептид MASP-2, содержащий полную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, можно использовать для индукции анти-MASP-2 антител, полезных в способе по изобретению. Конкретные домены MASP-2, которые, как известно, вовлечены в белок-белковые взаимодействия, например, домены CUBI и CUBIEGF, а также область, включающую активный центр сериновой протеазы, можно экспрессировать в виде рекомбинантных полипептидов, как описано в примере 3, и использовать в качестве антигенов. Кроме того, пептиды, содержащие часть из по меньшей мере 6 аминокислот полипептида MASP-2 (SEQ ID NO: 6), также могут быть использованы для индукции анти-MASP-2 антител. Дополнительные примеры полученных из MASP-2 антигенов, полезных для индукции анти-MASP-2 антител, приведены ниже в ТАБЛИЦЕ 2. Пептиды и полипептиды MASP-2, используемые для получения антител, можно получать в виде природных полипептидов, либо рекомбинантных или синтетических пептидов, а также каталитически неактивных рекомбинантных полипептидов, таких как MASP-2A, как дополнительно описано в примерах 5-7. В некоторых вариантах осуществления данного аспекта изобретения анти-MASP-2 антитела получают с использованием трансгенной линии мышей, как описано в примерах 8 и 9, и дополнительно описано ниже.

Антигены, которые могут быть использованы для получения анти-MASP-2 антител, также включают слитые полипептиды, такие как продукты слияния MASP-2, или его части, с полипептидом иммуноглобулина или с мальтоза-связывающим белком. Полипептидный иммуноген может представлять собой полноразмерную молекулу или ее

часть. Если часть полипептида подобна гаптену, такую часть можно успешно объединять или связывать с макромолекулярным носителем (таким как гемоцианин морского блюдечка (KLH), бычий сывороточный альбумин (BSA) или токсоид столбняка) для иммунизации.

ТАБЛИЦА 2: ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ MASP-2 АНТИГЕНЫ

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
SEQ ID NO: 6	Человеческий белок MASP-2
SEQ ID NO: 51	Мышиный белок MASP-2
SEQ ID NO: 8	Домен CUBI человеческого MASP-2 (ак 1-121 в SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 9	Домены CUBIEGF человеческого MASP-2 (ак 1-166 в SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 10	Домены CUBIEGFCUBII человеческого MASP-2 (ак 1-293 в SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 11	Домен EGF человеческого MASP-2 (ак 122-166 в SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 12	Домен сериновой протеазы человеческого MASP-2 (ак 429-671 в SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 13 GKDSCRGDAGGALVFL	Мутантная форма инактивированной сериновой протеазы (ак 610-625 в SEQ ID NO: 6 с мутацией Ser 618)
SEQ ID NO: 14 TPLGPKWPEPVFGRL	Человеческий пептид CUBI
SEQ ID NO: 15: TAPPGYRLRLYFTHFDLELSH LCEYDFVKLSSGAKVLATLCG Q	Человеческий пептид CUBI
SEQ ID NO: 16: TFRSDYSN	MBL-связывающая область в человеческом домене CUBI
SEQ ID NO: 17: FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFT GF	MBL-связывающая область в человеческом домене CUBI
SEQ ID NO: 18 IDECQVAPG	Пептид EGF

SEQ ID NO: 19 ANMLCAGLESGGKDSCRGDS GGALV	Пептид из активного центра сериновой протеазы

Поликлональные антитела

Поликлональные антитела против MASP-2 можно получать путем иммунизации животного полипептидом MASP-2, или его иммуногенным фрагментом, с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области. Смотри, например, Green et al., «Production of Polyclonal Antisera», в: Immunochemical Protocols (Manson, ed.), стр. 105, а также описание в примере 6. Иммуногенность полипептида MASP-2 можно повышать за счет использования адъюванта, включая минеральные гели, такие как гидроксид алюминия, или адъювант Фрейнда (полный или неполный), поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, полиолы типа плюроник®, полианионы, масляные эмульсии, гемоцианин морского блюдечка и динитрофенол. Поликлональные антитела, как правило, получают у таких животных, как лошади, коровы, собаки, куры, крысы, мыши, кролики, морские свинки, козы или овцы. Альтернативно, анти-MASP-2 антитело, полезное по настоящему изобретению, также можно получать у приматов. Общие методы получения полезных для диагностики и терапии антител у бабуинов описаны, например, в Goldenberg et al., международной публикации патента № WO 91/11465, и в публикации Losman, M.J., et al., Int. J. Cancer 46:310, 1990. Из крови таких иммунизированных животных затем получают сыворотку, содержащую иммунологически активные антитела, стандартными методами, хорошо известными в данной области.

Моноклональные антитела

В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 средство представляет собой анти-MASP-2 моноклональное антитело. Анти-MASP-2 моноклональные антитела является высокоспецифичными, направленными против одного эпитопа MASP-2. Используемое в настоящем документе определение «моноклональное» указывает на характер антитела, как полученного из практически гомогенной популяции антител, и его не следует понимать как указание на необходимость получения антитела каким-либо конкретным методом. Моноклональные антитела можно получать с использованием любого метода, который приводит к продуцированию молекул антитела стабильными клеточными линиями в культуре, такого как метод гибридом, описанный в Kohler, G., et al., Nature 256:495, 1975, или их можно получать методами рекомбинантных ДНК (смотри, например, патент США № 4816567, выданный Cabilly). Моноклональные антитела также можно получать из библиотек антител в фаге с использованием методов, описанных в Clackson, T., et al., Nature 352:624-628, 1991, и Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991. Такие антитела могут относиться к любому классу иммуноглобулинов, включая IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, а также любому их подклассу.

Например, моноклональные антитела можно получать, вводя инъекцией подходящему млекопитающему (например, мыши BALB/c) композицию, содержащую

полипептид MASP-2 или его часть. Через определенный период времени спленоциты извлекают из мыши и суспендируют в среде для культивирования клеток. Затем производят слияние спленоцитов с иммортализованными линейными клетками, получая гибридому. Полученные гибридомы выращивают в среде для культивирования клеток и проводят их скрининг на способность продуцировать моноклональное антитело против MASP-2. Более подробно продуцирование анти-MASP-2 моноклональных антител описано в примере 7. (Смотри также Current Protocols in Immunology, Vol. 1., John Wiley & Sons, страницы 2.5.1-2.6.7, 1991.)

Человеческие моноклональные антитела можно получать путем использования трансгенных мышей, которые были генетически модифицированы для продуцирования специфических человеческих антител в ответ на введение антигена. В этом методе элементы локуса тяжелой и легкой цепи человеческого иммуноглобулина вводят линейным мышам, полученным с использованием линий эмбриональных стволовых клеток, имеющих таргетированные нарушения в локусах тяжелой и легкой цепей эндогенных иммуноглобулинов. Трансгенные мыши могут синтезировать человеческие антитела, специфические для человеческих антигенов, таких как антигены MASP-2, описанные в настоящем документе, и мышей можно использовать для получения гибридом, секретирующих анти-MASP-2 антитело, путем слияния В-клеток от таких животных с соответствующими линейными клетками миеломы с использованием общепринятой технологии Келлера-Мильштейна, как дополнительно описано в примере 7. Трансгенные мыши с генами человеческих иммуноглобулинов коммерчески доступны (например, от Abgenix, Inc., Fremont, CA, и Medarex, Inc., Annandale, N.J.). Методы получения человеческих антител от трансгенных мышей описаны, например, в Green, L.L., et al., Nature Genet. 7:13, 1994; Lonberg, N., et al., Nature 368:856, 1994; и Taylor, L.D., et al., Int. Immun. 6:579, 1994.

Моноклональные антитела можно выделять и очищать из культуры гибридом различными хорошо известными методами. Такие методы выделения включают аффинную хроматографию на протеин А-сефарозе, эксклюзионную хроматографию и ионообменную хроматографию (смотри, например, Coligan на страницах 2.7.1-2.7.12 и страницах 2.9.1-2.9.3; Baines et al., «Purification of Immunoglobulin G (IgG)», в Methods in Molecular Biology, The Humana Press, Inc., Vol. 10, страницы 79-104, 1992).

После получения поликлональные, моноклональные или полученные в фаге антитела сначала тестируют на специфическое связывание MASP-2. Можно использовать различные анализы, известные специалистам в данной области, для обнаружения антител, которые специфически связывают MASP-2. Иллюстративные анализы включают вестерн-блот анализ или анализ иммунопреципитации стандартными методами (например, как описано в Ausubel et al.), иммуноэлектрофорез, иммуноферментные анализы, дот-блот анализ, анализы ингибирования или конкуренции, и анализы в сэндвич-формате (описано в Harlow and Land, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). После идентификации антител, специфически связывающих MASP-2, анти-MASP-2

антитела тестируют на способность действовать в качестве ингибирующего MASP-2 средства в одном из ряда анализов, например, в анализе лектин-специфического расщепления C4 (описанном в примере 2), анализе отложения C3b (описанном в примере 2) или анализе отложения C4b (описанном в примере 2).

Аффинность анти-MASP-2 моноклональных антител может с легкостью определять специалист в данной области (смотри, например, Scatchard, A., NY Acad. Sci. 51:660-672, 1949). В одном варианте осуществления анти-MASP-2 моноклональные антитела, полезные в способах по изобретению, связывают MASP-2 с аффинностью связывания <100 нМ, предпочтительно <10 нМ и наиболее предпочтительно <2 нМ. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 моноклональное антитело, полезное в способах по изобретению, представляет собой ингибирующее MASP-2 моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее (I) (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: i) CDR-H1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 31-35 в SEQ ID NO: 67; и ii) CDR-H2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-65 в SEQ ID NO: 67; и iii) CDR-H3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 95-102 в SEQ ID NO: 67, и b) вариабельную область легкой цепи, содержащую: i) CDR-L1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 24-34 в SEQ ID NO: 70; и ii) CDR-L2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-56 в SEQ ID NO: 70; и iii) CDR-L3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 89-97 в SEQ ID NO: 70, или (II) его вариант, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67), и вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 70.

Химерные/гуманизированные антитела

Моноклональные антитела, полезные в способе по изобретению, включают химерные антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от конкретных биологических видов или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, при этом остальная часть цепи(ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от другого биологического вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител; а также фрагменты таких антител (патент США № 4816567, выданный Cabilly; и Morrison,

S.L., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81:6851-6855, 1984).

Одной из форм химерного антитела, полезного по изобретению, является гуманизированное моноклональное анти-MASP-2 антитело. Гуманизированные формы не принадлежащих человеку (например, мышиных) антител представляют собой химерные антитела, содержащие минимальную последовательность из не принадлежащего человеку иммуноглобулина. Гуманизированные моноклональные антитела получают путем переноса определяющих комплементарность областей (CDR) не принадлежащего человеку (например, мышиного) антитела из вариабельных областей тяжелых и легких цепей мышиного иммуноглобулина в вариабельный домен человеческого антитела. Как правило, остатки человеческого антитела затем вводят в каркасные области для замены соответствующих не принадлежащих человеку остатков. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, отсутствующие в реципиентном антителе или в донорском антителе. Эти модификации выполняют для дополнительного совершенствования функционирования антитела. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать практически все из по меньшей мере одного и, как правило, двух вариабельных доменов, в которых все, или практически все, из гипервариабельных петель соответствуют таковым у не принадлежащего человеку иммуноглобулина, а все, или практически все, из каркасных областей Fv имеют последовательность человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело, необязательно, также будет содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, константной области человеческого иммуноглобулина. Для подробной информации смотри Jones, P.T., et al., Nature 321:522-525, 1986; Reichmann, L., et al., Nature 332:323-329, 1988; и Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992.

Гуманизированные антитела, полезные по изобретению, включают человеческие моноклональные антитела, содержащие по меньшей мере MASP-2-связывающую область CDR3. Кроме того, Fc-области могут быть заменены, с тем чтобы получать IgA или IgM, а также IgG антитела человека. Такие гуманизированные антитела будут иметь конкретное клиническое применение, поскольку они будут специфически узнавать человеческий MASP-2, но не будут индуцировать иммунный ответ у человека против самого антитела. Следовательно, они больше подходят для in vivo введения человеку, особенно, если необходимо повторное или долгосрочное введение.

Получение гуманизированного анти-MASP-2 антитела из мышиного анти-MASP-2 моноклонального антитела описано в настоящем документе в примере 6. Методы получения гуманизированных моноклональных антител также описаны, например, в Jones, P.T., et al., Nature 321:522, 1986; Carter, P., et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89:4285, 1992; Sandhu, J.S., Crit. Rev. Biotech. 12:437, 1992; Singer, I.I., et al., J. Immun. 150:2844, 1993; Sudhir (ed.), Antibody Engineering Protocols, Humana Press, Inc., 1995; Kelley, «Engineering Therapeutic Antibodies», в: Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al. (eds.), John Wiley & Sons, Inc., страницы 399-434, 1996; и в патенте США № 5693762, выданном Queen, 1997. Кроме того, существуют коммерческие организации, которые

синтезируют гуманизированные антитела из конкретных областей мышиного антитела, например, Protein Design Labs (Mountain View, CA).

Рекомбинантные антитела

Анти-MASP-2 антитела также можно получать с использованием рекомбинантных методов. Например, человеческие антитела можно получать с использованием экспрессионных библиотек человеческих иммуноглобулинов (доступных, например, от компании Stratagene, Corp., La Jolla, CA) для получения фрагментов человеческих антител (VH, VL, Fv, Fd, Fab или $F(ab')_2$). Эти фрагменты затем используют для конструирования целых человеческих антител с использованием методов, аналогичных методам получения химерных антител.

Антиидиотипические антитела

После идентификации анти-MASP-2 антител с нужной ингибирующей активностью эти антитела можно использовать для получения антиидиотипических антител, имеющих сходство с частью MASP-2, с использованием методов, хорошо известных в данной области. Смотри, например, Greenspan, N.S., et al., FASEB J. 7:437, 1993. Например, антитела, которые связывают MASP-2 и полностью ингибируют взаимодействия белка MASP-2, необходимые для активации комплемента, можно использовать для получения антиидиотипических антител, имеющих сходство с сайтом связывания MBL на белке MASP-2, и, следовательно, связывать и нейтрализовать связывание лиганда MASP-2, такого как, например, MBL.

Фрагменты иммуноглобулинов

Ингибирующие MASP-2 средства, полезные в способе по изобретению, включают не только интактные молекулы иммуноглобулинов, но также и хорошо известные фрагменты, включая фрагменты Fab, Fab', $F(ab)_2$, $F(ab')_2$ и Fv, scFv фрагменты, диатела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

В данной области хорошо известно, что лишь небольшая часть молекулы антитела, паратоп, участвует в связывании антитела с его эпитопом (смотри, например, Clark, W.R., The Experimental Foundations of Modern Immunology, Wiley & Sons, Inc., NY, 1986). Области pFc' и Fc антитела являются эффекторами классического пути комплемента, но не участвуют в связывании антигена. Антитело, от которого область pFc' была ферментативно отщеплена, или которое было получено без области pFc', называется фрагментом $F(ab')_2$ и сохраняет оба антигенсвязывающих сайта интактного антитела. Выделенный фрагмент $F(ab')_2$ называют бивалентным моноклональным фрагментом из-за его двух антигенсвязывающих сайтов. Аналогично, антитело, от которого область Fc была ферментативно отщеплена, или которое было получено без области Fc, называется фрагментом Fab и сохраняет один из антигенсвязывающих сайтов интактной молекулы антитела.

Фрагменты антител можно получать путем протеолитического гидролиза, например, расщепления пепсином или папаином, целого антитела общепринятыми

методами. Например, фрагменты антител можно получать путем ферментативного расщепления антител пепсином, с получением 5S фрагмента, называемого $F(ab')_2$. Этот фрагмент можно дополнительно расщеплять с использованием восстанавливающего тиоловые группы реагента, с получением 3,5S одновалентных фрагментов Fab'. Необязательно, реакцию расщепления можно проводить с использованием блокирующей группы для сульфгидрильных групп, которые возникают в результате расщепления дисульфидных связей. В качестве альтернативы, ферментативное расщепление с использованием пепсина непосредственно приводит к получению двух одновалентных фрагментов Fab и фрагмента Fc. Эти методы описаны, например, в патенте США № 4331647, выданном Goldenberg; Nisonoff, A., et al., Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, R.R., Biochem. J. 73:119, 1959; Edelman, et al., Methods in Enzymology 1:422, Academic Press, 1967; и в публикации Coligan на страницах 2.8.1-2.8.10 и 2.10.-2.10.4.

В некоторых вариантах осуществления использование фрагментов антител, лишенных области Fc, является предпочтительным во избежание активации классического пути комплемента, который запускается при связывании Fc с рецептором Fcγ. Существуют несколько способов, с помощью которых можно получать моАт, не участвующее во взаимодействии с рецептором Fcγ. Например, область Fc моноклонального антитела можно удалять химическим путем частичного расщепления протеолитическими ферментами (например, расщепления фицином), получая при этом, например, антигенсвязывающие фрагменты антител, такие как фрагменты Fab или $F(ab)_2$ (Mariani, M., et al., Mol. Immunol. 28:69-71, 1991). Альтернативно, человеческое IgG антитело изотипа γ4, которое не связывает рецепторы Fcγ, можно использовать при конструировании гуманизированного антитела, как описано в настоящем документе. Антитела, одноцепочечные антитела и антигенсвязывающие домены, лишенные домена Fc, также можно конструировать с использованием рекомбинантных методов, описанных в настоящем документе.

Одноцепочечные фрагменты антител

Альтернативно, можно создавать связывающие молекулы из одной пептидной цепи, специфичные для MASP-2, в которых области Fv тяжелой и легкой цепей соединены. Фрагменты Fv можно связывать пептидным линкером, с получением одноцепочечного антигенсвязывающего белка (scFv). Эти одноцепочечные антигенсвязывающие белки получают путем конструирования структурного гена, содержащего последовательности ДНК, кодирующие домены VH и VL, связанные олигонуклеотидом. Структурный ген вставляют в экспрессионный вектор, который затем вводят в клетку-хозяина, такую как E. coli. Рекомбинантные клетки-хозяева синтезируют одну полипептидную цепь с пептидным линкером, соединяющим между собой V-домены. Методы получения scFv описаны, например, в: Whitlow, et al., «Methods: A Companion to Methods in Enzymology» 2:97, 1991; Bird, et al., Science 242:423, 1988; патенте США № 4946778, выданном Ladner; Pack, P., et al., Bio/Technology 11:1271, 1993.

В качестве иллюстративного примера MASP-2-специфические scFv можно

получать, подвергая лимфоциты воздействию полипептида MASP-2 in vitro и проводя селекцию библиотек фагового дисплея антител или аналогичных векторов (например, путем использования иммобилизованного или меченого белка или пептида MASP-2). Гены, кодирующие полипептиды, имеющие потенциальные связывающие полипептид MASP-2 домены, можно получать путем скрининга случайных пептидных библиотек дисплея на фаге или бактерии, такой как E. coli. Эти случайные библиотеки пептидного дисплея можно использовать для скрининга на пептиды, которые взаимодействуют с MASP-2. Методы создания и скрининга таких случайных библиотек пептидного дисплея хорошо известны в данной области (патент США № 5223409, выданный Lardner; патент США № 4946778, выданный Ladner; патент США № 5403484, выданный Lardner; патент США № 5571698, выданный Lardner; и Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins Academic Press, Inc., 1996), и случайные библиотеки пептидного дисплея, а также наборы для скрининга таких библиотек, коммерчески доступны, например, от компаний CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif.), Invitrogen Inc. (San Diego, Calif.), New England Biolabs, Inc. (Beverly, Mass.) и Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, N.J.).

Другой формой анти-MASP-2 фрагмента антитела, полезной в данном аспекте изобретения, является пептид, соответствующий одной определяющей комплементарность области (CDR), который связывает эпитоп на антигене MASP-2 и ингибирует MASP-2-зависимую активацию комплемента. Пептиды CDR («минимальные узнающие единицы») можно получать путем конструирования генов, кодирующих CDR интересующего антитела. Такие гены получают, например, с использованием полимеразной цепной реакции для синтеза вариабельной области с РНК антитело-продуцирующих клеток (смотри, например, Larrick et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106, 1991; Courtenay-Luck, «Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies», в: Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al. (eds.), page 166, Cambridge University Press, 1995; и Ward et al., «Genetic Manipulation and Expression of Antibodies», в: Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al. (eds.), page 137, Wiley-Liss, Inc., 1995).

Анти-MASP-2 антитела, описанные в настоящем документе, вводят субъекту, который нуждается в этом, для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 средство представляет собой высокоаффинное человеческое или гуманизированное моноклональное анти-MASP-2 антитело с редуцированной эффекторной функцией.

Пептидные ингибиторы

В некоторых вариантах осуществления данного аспекта изобретения ингибирующее MASP-2 средство включает выделенные пептидные ингибиторы MASP-2, включая выделенные природные пептидные ингибиторы и синтетические пептидные ингибиторы, которые ингибируют MASP-2-зависимую систему активации комплемента. Используемый в настоящем документе термин «выделенные пептидные ингибиторы MASP-2» означает пептиды, которые ингибируют MASP-2-зависимую активацию

комплемента путем связывания, конкуренции с MASP-2 за связывание, другой молекулы узнавания (например, MBL, H-фиколина, M-фиколина или L-фиколина) в лектиновом пути, и/или путем прямого взаимодействия с MASP-2, с ингибированием MASP-2-зависимой активации комплемента, и которые являются практически чистыми и практически свободными от других веществ, с которыми они могут быть обнаружены в природе, до такой степени, которая является практической и подходящей для их намеченного применения.

Пептидные ингибиторы были успешно использованы in vivo для блокирования белок-белковых взаимодействий и каталитических центров. Например, пептидные ингибиторы молекул адгезии, структурно родственные LFA-1, недавно были одобрены для клинического применения при коагулопатиях (Ohman, E.M., et al., European Heart J. 16:50-55, 1995). Описаны короткие линейные пептиды (<30 аминокислот), которые предотвращают или препятствуют интегрин-зависимой адгезии (Murayama, O., et al., J. Biochem. 120:445-51, 1996). Более длинные пептиды, имеющие длину в диапазоне от 25 до 200 аминокислотных остатков, также были успешно использованы для блокирования интегрин-зависимой адгезии (Zhang, L., et al., J. Biol. Chem. 271(47):29953-57, 1996). Как правило, более длинные пептидные ингибиторы имеют более высокую аффинность и/или более низкие скорости диссоциации, чем короткие пептиды, и, таким образом, могут быть более сильными ингибиторами. Циклические пептидные ингибиторы, как показано, также являются эффективными ингибиторами интегринов in vivo для лечения воспалительных заболеваний человека (Jackson, D.Y., et al., J. Med. Chem. 40:3359-68, 1997). Один способ получения циклических пептидов включает синтез пептидов, в которых концевые аминокислоты пептида представляют собой остатки цистеина, что позволяет пептиду существовать в циклической форме за счет образования дисульфидных связей между концевыми аминокислотами, что, как показано, увеличивает аффинность и время полувыведения in vivo, их используют для лечения гемопоэтических новообразований (например, патент США № 6649592, выданный Larson).

Синтетические пептидные ингибиторы MASP-2

Примерами ингибирующих MASP-2 пептидов, полезных в способах по данному аспекту изобретения, являются аминокислотные последовательности, которые имитируют области-мишени, важные для функции MASP-2. Ингибирующие пептиды, полезные при осуществлении на практике способов по изобретению, имеют размер в диапазоне от примерно 5 аминокислот до примерно 300 аминокислот. В ТАБЛИЦЕ 3 приведен список иллюстративных ингибирующих пептидов, которые могут быть использованы при осуществлении на практике данного аспекта настоящего изобретения. Потенциальный ингибирующий MASP-2 пептид можно тестировать на наличие способности действовать в качестве ингибирующего MASP-2 средства в одном из ряда анализов, включая, например, анализ лектин-специфического расщепления C4 (описанный в примере 2) и анализ отложения C3b (описанный в примере 2).

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 пептиды являются

производными от полипептидов MASP-2 и выбраны из полноразмерного зрелого белка MASP-2 (SEQ ID NO: 6) или из конкретного домена белка MASP-2, такого как, например, домен CUBI (SEQ ID NO: 8), домен CUBIEGF (SEQ ID NO: 9), домен EGF (SEQ ID NO: 11) и домен сериновой протеазы (SEQ ID NO: 12). Как описано ранее, показано, что области CUBEGFCUBII необходимы для димеризации и связывания с MBL (Thielens et al., выше). В частности, показано, что пептидная последовательность TFRSDYN (SEQ ID NO: 16) в домене CUBI MASP-2 вовлечена в связывание с MBL в исследовании, в котором был обнаружен человек, имеющий гомозиготную мутацию Asp105 на Gly105, что приводит к потере MASP-2 из комплекса с MBL (Stengaard-Pedersen, K., et al., New England J. Med. 349:554-560, 2003).

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 пептиды являются производными от белков лектинов, которые связывают MASP-2 и участвуют в лектиновом пути комплемента. Было идентифицировано несколько разных лектинов, которые участвуют в этом пути, включая маннан-связывающий лектин (MBL), L-фиколин, M-фиколин и H-фиколин. (Ikeda, K., et al., J. Biol. Chem. 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M., et al., J. Exp. Med. 176:1497-2284, 2000; Matsushita, M., et al., J. Immunol. 168:3502-3506, 2002). Эти лектины присутствуют в сыворотке в виде олигомеров из гомотримерных субъединиц, каждая из которых имеет N-концевые коллаген-подобные волокна с доменами узнавания углевода. Эти разные лектины, как было показано, связывают MASP-2, и комплекс лектин/MASP-2 активирует комплемент путем расщепления белков C4 и C2. H-фиколин имеет амино-концевую область из 24 аминокислот, коллаген-подобный домен с 11 повторами Gly-Xaa-Yaa, горловинный домен из 12 аминокислот и фибриноген-подобный домен из 207 аминокислот (Matsushita, M., et al., J. Immunol. 168:3502-3506, 2002). H-фиколин связывает GlcNAc и вызывает агглютинацию человеческих эритроцитов, покрытых LPS из S. typhimurium, S. minnesota и E. coli. H-фиколин, как показано, связан с MASP-2 и MAp19 и активирует лектиновый путь (там же). L-фиколин/P35 также связывает GlcNAc и, как показано, связан с MASP-2 и MAp19 в человеческой сыворотке, и показано, что этот комплекс активирует лектиновый путь (Matsushita, M., et al., J. Immunol. 164:2281, 2000). Соответственно, ингибирующие MASP-2 пептиды, полезные по настоящему изобретению, могут содержать область из по меньшей мере 5 аминокислот, выбранную из белка MBL (SEQ ID NO: 21), белка H-фиколина (регистрационный номер Genbank NM_173452), белка M-фиколина (регистрационный номер Genbank O00602) и белка L-фиколина (регистрационный номер Genbank NM_015838).

Более конкретно, ученые обнаружили, что MASP-2-связывающий сайт на MBL находится в пределах 12 триплетов Gly-X-Y «GKD GRD GTK GEK GEP GQG LRG LQG POG KLG POG NOG PSG SOG PKG QKG DOG KS» (SEQ ID NO: 26), которые располагаются между шарниром и горловинной частью в C-концевой части коллаген-подобного домена MBP (Wallis, R., et al., J. Biol. Chem. 279:14065, 2004). Эта область MASP-2-связывающего сайта также является высоко консервативной в человеческом H-

фиколине и человеческом L-фиколине. Описан консенсусный сайт связывания, присутствующий во всех трех белках лектинах, который содержит аминокислотную последовательность «OGK-X-GP» (SEQ ID NO: 22), где буква «O» представляет гидроксипролин, и буква «X» представляет гидрофобный остаток (Wallis et al., 2004, выше). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 пептиды, полезные по данному аспекту изобретения, имеют длину по меньшей мере 6 аминокислот и содержат SEQ ID NO: 22. Пептиды, производные от MBL, которые содержат аминокислотную последовательность «GLR GLQ GPO GKL GPO G» (SEQ ID NO: 24), как показано, связывают MASP-2 in vitro (Wallis, et al., 2004, *выше*). Для усиления связывания с MASP-2 можно синтезировать пептиды, которые фланкированы двумя триплетами GPO на каждом конце («GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GGP OGP O» SEQ ID NO: 25), для стимуляции образования тройных спиралей, которые обнаружены в естественном белке MBL (как дополнительно описано в Wallis, R., et al., J. Biol. Chem. 279:14065, 2004).

Ингибирующие MASP-2 пептиды также могут быть производными от человеческого H-фиколина, который содержит последовательность «GAO GSO GEK GAO GPQ GPO GPO GKM GPK GEO GDO» (SEQ ID NO: 27) из консенсусной MASP-2-связывающей области в H-фиколине. Также включены пептиды, производные от человеческого L-фиколина, которые содержат последовательность «GCO GLO GAO GDK GEA GTN GKR GER GPO GPO GKA GPO GPN GAO GEO» (SEQ ID NO: 28) из консенсусной MASP-2-связывающей области в L-фиколине.

Ингибирующие MASP-2 пептиды также могут быть производными от сайта расщепления C4, такого как «LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI» (SEQ ID NO: 29), который представляет собой сайт расщепления C4, связанный с C-концевой частью антитромбина III (Glover, G.I., et al., Mol. Immunol. 25:1261 (1988)).

ТАБЛИЦА 3: ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ИНГИБИРУЮЩИЕ MASP-2 ПЕПТИДЫ

SEQ ID NO	Источник
SEQ ID NO: 6	Человеческий белок MASP-2
SEQ ID NO: 8	Домен CUBI в MASP-2 (ак 1-121 в SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 9	Домены CUBIEGF в MASP-2 (ак 1-166 в SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 10	Домены CUBIEGFCUBII в MASP-2 (ак 1-293 в SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 11	Домен EGF в MASP-2 (ак 122-166)
SEQ ID NO: 12	Домен сериновой протеазы в MASP-2 (ак 429-671)
SEQ ID NO: 16	MBL-связывающая область в MASP-2
SEQ ID NO: 3	Человеческий MAp19
SEQ ID NO: 21	Человеческий белок MBL

SEQ ID NO: 22 OGK-X-GP, где «O» = гидроксипролин, и «X» представляет собой гидрофобный аминокислотный остаток	Синтетический пептид консенсусного сайта связывания из человеческого MBL и человеческих фиколинов
SEQ ID NO: 23 OGKLG	Центральный связывающий сайт человеческого MBL
SEQ ID NO: 24 GLR GLQ GPO GKL GPO G	Триплеты 6-10 человеческого MBP - демонстрируют связывание с MASP-2
SEQ ID NO: 25 GPOGPOGLRGLQGPOGKLGP OGGPOGPO	Триплеты человеческого MBP с добавленными GPO для стимуляции образования тройных спиралей
SEQ ID NO: 26 GKDGRDGTKGEKGEPGQGL RGLQGPOGKLGPOGNOGPS GSOGPKGQKGDOGKS	Триплеты 1-17 человеческого MBP
SEQ ID NO: 27 GAOGSOGEKGAOGPQGPOG POGKMGPKGEOGDO	Человеческий H-фиколин (Hataka)
SEQ ID NO: 28 GCOGLOGAOGDKGEAGTNG KRGERGPOGPOGKAGPOGP NGAOGEO	Человеческий L-фиколин P35
SEQ ID NO: 29 LQRALEILPNRVTIKANRPFL VFI	Сайт расщепления человеческого C4

Примечание: буква «O» представляет гидроксипролин. Буква «X» представляет гидрофобный остаток.

Пептиды, производные от сайта расщепления C4, а также другие пептиды, которые ингибируют сайт сериновой протеазы MASP-2, могут быть химически модифицированы так, что они становятся необратимыми ингибиторами протеазы. Например, соответствующие модификации могут включать, но без ограничения, галометилкетоны (Br, Cl, I, F) на C-конце, Asp или Glu, или присоединенные к функциональным боковым цепям; галоацетильные (или другие α-галоацетильные) группы на аминогруппах или других функциональных боковых цепях; эпоксидные или имин-содержащие группы на

амино- или карбоксильном концах, или на функциональных боковых цепях; или сложные имидатные эфиры на амино- или карбоксильном концах, или на функциональных боковых цепях. Такие модификации обеспечили бы преимущество постоянного ингибирования фермента при ковалентном присоединении пептида. Это могло бы позволить снижать эффективные дозы и/или менее часто вводить пептидный ингибитор.

Помимо ингибирующих пептидов, описанных выше, ингибирующие MASP-2 пептиды, полезные в способе по изобретению, включают пептиды, содержащие MASP-2-связывающую область CDR3 из анти-MASP-2 моАт, полученного, как описано в настоящем документе. Последовательность областей CDR для использования в синтезе пептидов, можно определять методами, известными в данной области. Вариабельная область тяжелой цепи представляет собой пептид, который, как правило, имеет длину в диапазоне от 100 до 150 аминокислот. Вариабельная область легкой цепи представляет собой пептид, который, как правило, имеет длину в диапазоне от 80 до 130 аминокислот. Последовательности CDR в составе вариабельных областей тяжелой и легкой цепей содержат последовательности длиной лишь примерно 3-25 аминокислот, которые могут быть с легкостью секвенированы специалистами в данной области.

Специалисты в данной области понимают, что в значительной степени гомологичные варианты ингибирующих MASP-2 пептидов, описанных выше, также будут проявлять MASP-2-ингибирующую активность. Иллюстративные варианты включают, но не обязательно ограничиваются ими, пептиды, имеющие вставки, делеции, замены и/или добавления аминокислот на карбоксильной или амино-концевой частях конкретных пептидов и их смесей. Соответственно, считается, что эти гомологичные пептиды, имеющие MASP-2-ингибирующую активность, могут быть использованы в способах по настоящему изобретению. Описанные пептиды также могут содержать дублированные мотивы и другие модификации с консервативными заменами. Консервативные варианты описаны в другом разделе настоящего документа и имеют замены одной аминокислоты на другую с аналогичным зарядом, размером или гидрофобностью, и тому подобным.

Ингибирующие MASP-2 пептиды могут быть модифицированы для увеличения растворимости и/или для максимального увеличения положительного или отрицательного заряда с целью более точной имитации сегмента интактного белка. Производное может иметь, или не иметь, точную первичную аминокислотную структуру пептида, раскрытого в настоящем документе, при условии, что производное функционально сохраняет нужное свойство ингибирования MASP-2. Модификации могут включать аминокислотную замену одной из общеизвестных двадцати аминокислот или другой аминокислотой, дериватизированной или замещенной аминокислотой с дополнительными желательными характеристиками, такими как устойчивость к расщеплению ферментами, или D-аминокислотой, или замену другой молекулой или соединением, таким как углевод, которое имитирует естественную конформацию и функцию аминокислоты, аминокислот или пептида; делецию аминокислоты; вставку аминокислоты, одной из общеизвестных двадцати аминокислот или другой аминокислоты, дериватизированной или замещенной

аминокислоты с дополнительными желательными характеристиками, такими как устойчивость к расщеплению ферментами, или D-аминокислоты, или замену другой молекулой или соединением, таким как углевод, которое имитирует естественную конформацию и функцию аминокислоты, аминокислот или пептида; или замену другой молекулой или соединением, такой как углеводный или нуклеотидный мономер, который имитирует естественную конформацию, распределение заряда и функцию исходного пептида. Пептиды также могут быть модифицированы путем ацетилирования или амидирования.

Синтез производных ингибирующих пептидов можно осуществлять известными методами биосинтеза пептидов, биосинтеза углеводов и тому подобного. В качестве исходной точки специалист может использовать соответствующие программы для определения конформации интересующего пептида. После установления конформации пептида, раскрытого в настоящем документе, специалист может определять путем рационального проектирования какой вид замен можно производить в одном или более сайтах для получения производного, который сохраняет основную конформацию и распределение заряда исходного пептида, но может иметь характеристики, отсутствующие у, или усиленные относительно характеристик, исходного пептида. После идентификации потенциальных молекул производных, производные можно тестировать для определения, действуют ли они в качестве ингибирующих MASP-2 средств, с использованием анализов, описанных в настоящем документе.

Скрининг на ингибирующие MASP*-2 пептиды*

Можно также использовать молекулярное моделирование и рациональное молекулярное проектирование для получения и скрининга пептидов, которые имитируют молекулярные структуры ключевых связывающих областей MASP-2 и ингибируют связанную с комплементом активность MASP-2. Молекулярные структуры, используемые для моделирования, включают области CDR анти-MASP-2 моноклональных антител, а также области-мишени, которые, как известно, важны для функции MASP-2, включая область, необходимую для димеризации, область, вовлеченную в связывание с MBL, и активный центр сериновой протеазы, как описано ранее. Способы идентификации пептидов, которые связывают конкретную мишень, хорошо известны в данной области. Например, можно использовать молекулярный импринтинг для de novo конструирования макромолекулярных структур, таких как пептиды, связывающих конкретную молекулу. Смотри, например, Shea, K.J., «Molecular Imprinting of Synthetic Network Polymers: The De Novo synthesis of Macromolecular Binding and Catalytic Sties», TRIP 2(5) 1994.

В качестве иллюстративного примера один из способов получения миметиков MASP-2-связывающих пептидов является следующим. Функциональные мономеры известного MASP-2-связывающего пептида или связывающей области анти-MASP-2 антитела, которое вызывает ингибирование MASP-2 (матрица), полимеризуют. Затем матрицу удаляют, с последующей полимеризацией мономеров второго класса в нише, оставленной после матрицы, с получением новой молекулы, которая обладает одним или

более из желательных свойств, аналогичных свойствам матрицы. Помимо получения пептидов таким способом, также можно получать другие MASP-2-связывающие молекулы, которые являются ингибирующими MASP-2 средствами, такие как полисахариды, нуклеозиды, лекарственные средства, нуклеопротеиды, липопротеины, углеводы, гликопротеины, стероиды, липиды и другие биологически активные материалы. Данный способ полезен для разработки самых разных биологических миметиков, которые являются более стабильными, чем их природные аналоги, поскольку они, как правило, получены путем свободнорадикальной полимеризации функциональных мономеров, приводящей к получению соединения с не биоразлагаемым каркасом.

Пептидный синтез

Ингибирующие MASP-2 пептиды можно получать методами, хорошо известными в данной области, такими как твердофазные методы синтеза, впервые описанные в публикации Merrifield, в: J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-2154, 1963. Можно использовать автоматизированный синтез, например, с использованием пептидного синтезатора Applied Biosystems 431A (Foster City, Calif.) в соответствии с инструкциями производителя. Описание других методов можно найти, например, в Bodanszky, M., et al., Peptide Synthesis, второе издание, John Wiley & Sons, 1976, а также в других литературных источниках, известных специалистам в данной области.

Пептиды также можно получать с использованием стандартных методов генетической инженерии, известных специалистам в данной области. Например, пептид можно получать ферментативными методами путем вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид, в экспрессионный вектор, экспрессирующий ДНК, и трансляции ДНК в пептид в присутствии необходимых аминокислот. Затем пептид очищают с использованием хроматографических или электрофоретических методов, или при помощи белка-носителя, который может быть слит, и впоследствии отщеплен от пептида, путем вставки в экспрессионный вектор в фазе с кодирующей пептид последовательностью нуклеотидной последовательности, кодирующей белок-носитель. Слитый белок-пептид можно выделять с использованием хроматографических, электрофоретических или иммунологических методов (таких как связывание со смолой через антитело к белку-носителю). Пептид можно отщеплять с использованием химических или ферментативных методов, например, при помощи гидролаз.

Ингибирующие MASP-2 пептиды, полезные в способе по изобретению, также можно получать в рекомбинантных клетках-хозяевах общепринятыми методами. Для экспрессии последовательности, кодирующей ингибирующий MASP-2 пептид, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая пептид, должна быть функционально связана с регуляторными последовательностями, которые контролируют транскрипционную экспрессию, в экспрессионном векторе, а затем введена в клетку-хозяина. Помимо регуляторных последовательностей транскрипции, таких как промоторы и энхансеры, экспрессионные векторы могут включать регуляторные последовательности трансляции и маркерный ген, который подходит для селекции клеток, несущих экспрессионный вектор.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие ингибирующий MASP-2 пептид, можно синтезировать при помощи «генных машин» с использованием таких методов, как фосфорамидитный метод. Если химически синтезированная двухцепочечная ДНК необходима для такого применения, как синтез гена или генного фрагмента, то каждую комплементарную цепь производят отдельно. Получение коротких генов (60-80 пар нуклеотидов) является технически простой задачей, которая может быть выполнена путем синтеза комплементарных цепей, с их последующим отжигом. Для получения более длинных генов синтетические гены (двухцепочечные) собирают в виде модулей из одноцепочечных фрагментов, имеющих длину от 20 до 100 нуклеотидов. Для обзора полинуклеотидного синтеза, смотри, например, Glick and Pasternak, «Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA», ASM Press, 1994; Itakura, K., et al., Annu. Rev. Biochem. 53:323, 1984; и Climie, S., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:633, 1990.

Низкомолекулярные ингибиторы

В некоторых вариантах осуществления ингибирующие MASP-2 средства представляют собой низкомолекулярные ингибиторы, включая природные и синтетические вещества, которые имеют низкую молекулярную массу, такие как, например, пептиды, пептидомиметики и непептидные ингибиторы (включая олигонуклеотиды и органические соединения). Низкомолекулярные ингибиторы MASP-2 можно получать на основе молекулярной структуры вариабельных областей анти-MASP-2 антител.

Низкомолекулярные ингибиторы также можно проектировать и создавать на основании кристаллической структуры MASP-2, используя компьютерный дизайн лекарственных средств (Kuntz I.D., et al., Science 257:1078, 1992). Кристаллическая структура крысиного MASP-2 описана (Feinberg, H., et al., EMBO J. 22:2348-2359, 2003). С использованием способа, описанного Kuntz с соавторами, используют координаты кристаллической структуры MASP-2 для ввода в компьютерную программу, такую как DOCK, которая генерирует список низкомолекулярных структур, которые предположительно будут связывать MASP-2. Использование таких компьютерных программ хорошо известно специалисту в данной области. Например, кристаллическую структуру ингибитора протеазы HIV-1 использовали для идентификации уникальных непептидных лигандов, которые представляют собой ингибитора протеазы HIV-1, путем оценки соответствия соединений в базе кристаллографических данных Кембриджа связывающему сайту фермента с использованием программы DOCK (Kuntz, I.D., et al., J. Mol. Biol. 161:269-288, 1982; DesJarlais, R.L., et al., PNAS 87:6644-6648, 1990).

Скрининг ряда низкомолекулярных структур, которые были идентифицированы компьютерным методом как потенциальные ингибиторы MASP-2, был проведен с использованием анализа связывания MASP-2, такого как анализ, описанный в примере 10. Малые молекулы, которые, как было установлено, связывают MASP-2, затем были проанализированы в функциональном анализе, таком как анализ, описанный в примере 2,

для определения того, ингибируют ли они MASP-2-зависимую активацию комплемента.

Растворимые рецепторы MASP-2

Другие подходящие ингибирующие MASP-2 средства, как считают, включают растворимые рецепторы MASP-2, которые могут быть получены с использованием методов, известных специалистам в данной области.

Ингибиторы экспрессии MASP-2

В другом варианте осуществления данного аспекта изобретения ингибирующее MASP-2 средство представляет собой ингибитор экспрессии MASP-2, способный к ингибированию MASP-2-зависимой активации комплемента. При осуществлении на практике данного аспекта изобретения репрезентативные ингибиторы экспрессии MASP-2 включают антисмысловые молекулы нуклеиновой кислоты MASP-2 (такие как антисмысловая мРНК, антисмысловая ДНК или антисмысловые олигонуклеотиды), рибозимы MASP-2 и молекулы РНКи MASP-2.

Антисмысловые молекулы РНК и ДНК действуют, непосредственно блокируя трансляцию мРНК MASP-2 за счет гибридизации с мРНК MASP-2 и предотвращая трансляцию белка MASP-2. Антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты может быть сконструирована множеством разных способов при условии, что она способна препятствовать экспрессии MASP-2. Например, антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты может быть сконструирована путем инверсии кодирующей области (или ее части) кДНК MASP-2 (SEQ ID NO: 4) относительно ее нормальной ориентации для транскрипции, с тем, чтобы происходила транскрипция ее комплемента.

Антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты, как правило, практически идентична по меньшей мере части гена или генов мишени. Однако нуклеиновая кислота не обязательно должна быть абсолютна идентична для ингибирования экспрессии. Как правило, можно использовать более высокую степень гомологии для компенсации использования более короткой антисмысловой молекулы нуклеиновой кислоты. Минимальный процент идентичности, как правило, превышает примерно 65%, однако более высокий процент идентичности может приводить к более эффективной репрессии экспрессии эндогенной последовательности. В целом, процент идентичности, превышающий примерно 80%, как правило, является предпочтительным, хотя степень от примерно 95% до абсолютной, как правило, является наиболее предпочтительный.

Антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты не обязательно должна иметь точно такой же паттерн интронов или экзонов, как ген-мишень, и не кодирующие сегменты гена-мишени могут быть в равной степени эффективными для достижения антисмыслового подавления экспрессии гена-мишени, как и кодирующие сегменты. Последовательность ДНК длиной по меньшей мере примерно 8, или около того, нуклеотидов можно использовать в качестве антисмысловой молекулы нуклеиновой кислоты, хотя предпочтительной является более длинная последовательность. По настоящему изобретению репрезентативным примером полезного ингибирующего средства для MASP-2 является антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты MASP-2,

которая по меньшей мере на девяносто процентов идентична комплементу кДНК MASP-2, состоящей из нуклеотидной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 4. Нуклеотидная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 4, кодирует белок MASP-2, состоящий из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 5.

Нацеливание антисмысловых олигонуклеотидов для связывания мРНК MASP-2 является другим механизмом, который можно использовать для снижения уровня синтеза белка MASP-2. Например, синтез полигалактуроназы и ацетилхолинового рецептора мускаринового типа 2 ингибируется антисмысловыми олигонуклеотидами, направленными на их соответствующие последовательности мРНК (патент США № 5739119, выданный Cheng, и патент США № 5759829, выданный Shewmaker). Кроме того, примеры антисмыслового ингибирования были продемонстрированы для ядерного белка циклина, гена множественной лекарственной устойчивости (MDG1), ICAM-1, E-селектина, STK-1, стриарных $GABA_A$ рецепторов и человеческого EGF (смотри, например, патент США № 5801154, выданный Baracchini; патент США № 5789573, выданный Baker; патент США № 5718709, выданный Considine и патент США № 5610288, выданный Reubenstein).

Описана система, позволяющая специалисту в данной области определять, какие олигонуклеотиды могут быть использованы по изобретению, включающая исследование соответствующих сайтов в мРНК-мишени путем расщепления РНКазой H в качестве показателя доступности последовательности в транскриптах. Scherr, M., et al., Nucleic Acids Res. 26:5079-5085, 1998; Lloyd, et al., Nucleic Acids Res. 29:3665-3673, 2001. Смесь антисмысловых олигонуклеотидов, комплементарных определенным областям транскрипта MASP-2, добавляют к экстрактам клеток, экспрессирующих MASP-2, таких как гепатоциты, и проводят гибридизацию для создания уязвимого для РНКазы H сайта. Этот метод можно объединять с выбором последовательности при помощи компьютерной программы, которая может предсказывать оптимальный выбор последовательности для антисмысловых композиций на основании их относительной способности к образованию димеров, шпилек или других вторичных структур, которые привели бы к уменьшению или устранению специфического связывания с мРНК-мишенью в клетке-хозяине. Этот анализ вторичной структуры и выбор сайта-мишени можно выполнять с использованием программы анализа олиго праймеров (Rychlik, I., 1997) и программы (алгоритма) BLASTN 2.0.5 (Altschul, S.F., et al., Nucl. Acids Res. 25:3389-3402, 1997). Антисмысловые соединения, направленные на последовательность-мишень, предпочтительно имеют длину от примерно 8 до примерно 50 нуклеотидов. Особенно предпочтительными являются антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие от примерно 9 до примерно 35, или около того, нуклеотидов. Авторы изобретения ожидают, что все олигонуклеотидные композиции с длиной в диапазоне от 9 до 35 нуклеотидов (то есть, длиной 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, или 35, или около того, нуклеотидов) является особенно предпочтительными при осуществлении на практике основанных на антисмысловых олигонуклеотидах способов по изобретению.

Особенно предпочтительными областями-мишенями в мРНК MASP-2 являются те, которые находятся в области, или рядом с областью, кодона инициации трансляции AUG, и те последовательности, которые являются в значительной степени комплементарными 5'-областям мРНК, например, областям от -10 до +10 в нуклеотидной последовательности гена MASP-2 (SEQ ID NO: 4). Иллюстративные ингибиторы экспрессии MASP-2 приведены в ТАБЛИЦЕ 4.

ТАБЛИЦА 4: ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ЭКСПРЕССИИ MASP-2

SEQ ID NO: 30 (нуклеотиды 22-680 в SEQ ID NO: 4)	Нуклеотидная последовательность кДНК MASP-2 (SEQ ID NO: 4), кодирующая CUBIEGF
SEQ ID NO: 31 5'CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC3	Нуклеотиды 12-45 в SEQ ID NO: 4, включая сайт начала трансляции MASP-2 (смысловая)
SEQ ID NO: 32 5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3'	Нуклеотиды 361-396 в SEQ ID NO: 4, кодирующие область, содержащую сайт связывания MBL MASP-2 (смысловая)
SEQ ID NO: 33 5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAAA3'	Нуклеотиды 610-642 в SEQ ID NO: 4, кодирующие область, содержащую домен CUBII

Как отмечено выше, используемый в настоящем документе термин «олигонуклеотид» означает олигомер или полимер рибонуклеиновой кислоты (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), или их миметики. Этот термин также охватывает олигонуклеотиды, состоящие из природных нуклеотидов, остатков сахара и ковалентных межнуклеозидных (каркасных) связей, а также олигонуклеотиды, имеющие неприродные модификации. Такие модификации позволяют придавать определенные желаемые свойства, которые отсутствуют у природных олигонуклеотидов, например, пониженные токсические свойства, повышенную стабильность против расщепления нуклеазами и повышенное поглощение клеткой. В иллюстративных вариантах осуществления антисмысловые соединения по изобретению отличаются от природной ДНК за счет модификаций фосфодиэфирных связей каркаса, в которых фосфатные заместители заменены на фосфоротиоаты для продления существования антисмыслового олигонуклеотида. Аналогично, один или более концов олигонуклеотида могут быть замещены одним или более акридиновыми производными, которые встраиваются между соседними парами нуклеотидов в цепи нуклеиновой кислоты.

Другой альтернативой антисмысловой последовательности является использование «РНК интерференции (РНКи). Двухцепочечные РНК (дцРНК) могут приводить к выключению гена у млекопитающих in vivo. Естественная функция РНКи и косупрессии, судя по всему, заключается в защите генома от проникновения мобильных генетических

элементов, таких как ретротранспозоны и вирусы, которые продуцируют аберрантную РНК или дцРНК в клетке-хозяине, когда они становятся активными (смотри, например, Jensen, J., et al., Nat. Genet. 21:209-12, 1999). Двухцепочечную молекулу РНК можно получать путем синтеза двух цепей РНК, способных к образованию двухцепочечной молекулы РНК, каждая из которых имеет длину примерно 19-25 (например, 19-23) нуклеотидов. Например, молекула дцРНК, полезная в способах по изобретению, может включать РНК, соответствующую последовательности и ее комплементу, которые приведены в ТАБЛИЦЕ 4. Предпочтительно, по меньшей мере одна цепь РНК имеет «липкий» 3'-конец из 1-5 нуклеотидов. Синтезированные цепи РНК объединяют в условиях, приводящих к образованию двухцепочечной молекулы. Последовательность РНК может содержать часть SEQ ID NO: 4 из по меньшей мере 8 нуклеотидов, с общей длиной, составляющей 25 нуклеотидов или менее. Конструирование последовательностей киРНК для конкретной мишени находится в пределах компетенции специалиста в данной области. Доступны коммерческие услуги по конструированию последовательности киРНК, с гарантией по меньшей мере 70% нокдауна экспрессии (Qiagen, Valencia, Calif).

дцРНК можно вводить в виде фармацевтической композиции известными методами, при этом нуклеиновую кислоту вводят в нужную клетку-мишень. Общепринятые методы переноса генов включают методы с фосфатом кальция, DEAE-декстраном, электропорацию, микроинъекцию и использование вирусов. Такие методы описаны в сборнике Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1993.

Рибозимы также можно использовать для снижения количества и/или биологической активности MASP-2, например, рибозимы, которые нацелены на мРНК MASP-2. Рибозимы представляют собой каталитические молекулы РНК, способные расщеплять молекулы нуклеиновой кислоты, имеющие последовательность, которая полностью или частично гомологична последовательности рибозима. Можно конструировать трансгены рибозимов, кодирующие РНК рибозимы, которые специфически спариваются с РНК-мишенью и расщепляют фосфодиэфирный каркас в определенном участке, тем самым функционально инактивируя РНК-мишень. При осуществлении этого расщепления сам рибозим не изменяется и, таким образом, способен к рециркуляции и расщеплению других молекул. Включение последовательностей рибозима в антисмысловые РНК придает последним РНК-расщепляющую активность, тем самым повышая активность антисмысловых конструктов.

Рибозимы, полезные при осуществлении на практике изобретения, как правило, содержат гибридизующуюся область из по меньшей мере примерно девяти нуклеотидов, которая комплементарна нуклеотидной последовательности по меньшей мере части мРНК MASP-2, и каталитическую область, которая приспособлена для расщепления мРНК-мишени MASP-2 (смотри в основном, EPA № 0 321 201; WO88/04300; Haseloff, J., et al., Nature 334:585-591, 1988; Fedor, M.J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1668-1672, 1990; Cech, T.R., et al., Ann. Rev. Biochem. 55:599-629, 1986).

Рибозимы могут быть либо направлены непосредственно к клеткам в форме РНК олигонуклеотидов, содержащих последовательности рибозима, либо введены в клетку в виде экспрессионного вектора, кодирующего нужную РНК рибозима. Рибозимы можно использовать и применять практически так же, как описано для антисмысловых полинуклеотидов.

Антисмысловые РНК и ДНК, рибозимы и молекулы РНКи, полезные в способах по изобретению, можно получать любым способом, известным в данной области для синтеза молекул ДНК и РНК. Сюда входят методы химического синтеза олигодезоксирибонуклеотидов и олигорибонуклеотидов, хорошо известные в данной области, такие как, например, твердофазный фосфорамидитный химический синтез. Альтернативно, молекулы РНК можно получать путем in vitro и in vivo транскрипции последовательностей ДНК, кодирующих антисмысловую молекулу РНК. Такие последовательности ДНК можно включать в самые разные векторы, содержащие подходящие промоторы РНК-полимеразы, такие как промоторы полимеразы T7 или SP6. Альтернативно, антисмысловые конструкты кДНК, которые синтезируют антисмысловую РНК конститутивно или индуцируемо, в зависимости от используемого промотора, можно стабильно вводить в линейные клетки.

Различные хорошо известные модификации молекул ДНК можно вводить в качестве средства для повышения стабильности и периода полувыведения. Полезные модификации включают, но без ограничения, добавление фланкирующих последовательностей из рибонуклеотидов или дезоксирибонуклеотидов на 5' и/или 3'-концах молекулы, или использование фосфоротиоата или 2'-O-метила вместо фосфодиэфирных связей в олигодезоксирибонуклеотидном каркасе.

VI. Фармацевтические композиции и способы доставки

В другом аспекте изобретение относится к композициям для ингибирования неблагоприятных эффектов MASP-2-зависимой активации комплемента у субъекта, страдающего от заболевания или состояния, раскрытого в настоящем документе, путем введения субъекту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество ингибирующего MASP-2 средства и фармацевтически приемлемый носитель. Ингибирующие MASP-2 средства можно вводить субъекту, который нуждается в этом, в терапевтически эффективных дозах для лечения или облегчения состояний, связанных с MASP-2-зависимой активацией комплемента. Терапевтически эффективная доза означает количество ингибирующего MASP-2 средства, достаточное для ослабления симптомов, связанных с заболеванием или состоянием.

Токсичность и терапевтическую эффективность ингибирующих MASP-2 средств можно определять стандартными фармацевтическими методами с использованием экспериментальных животных моделей, таких как модель на мышах MASP-2-/-, экспрессирующих человеческий трансген MASP-2, которая описана в примере 1. С использованием таких животных моделей можно определять NOAEL (дозу, не вызывающую наблюдаемых нежелательных эффектов) и MED (минимальную

эффективную дозу) стандартными методами. Отношение доз между эффектами NOAEL и MED представляет собой терапевтический индекс, который выражают в виде отношения NOAEL/MED. Ингибирующие MASP-2 средства, имеющие большие терапевтические индексы, или коэффициенты, являются наиболее предпочтительными. Данные, полученные в анализе на клеточных культурах и в исследованиях на животных, можно использовать для определения доз, применяемых для человека. Доза ингибирующего MASP-2 средства предпочтительно лежит в диапазоне циркулирующих концентраций, включающих MED с небольшой токсичностью, или без нее. Дозы могут варьироваться в пределах данного диапазона, в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения.

Для любого препарата соединения терапевтически эффективную дозу можно оценивать с использованием животных моделей. Например, дозу можно формулировать в животной модели для достижения диапазона циркулирующих концентраций в плазме, который включает MED. Количественные уровни ингибирующего MASP-2 средства в плазме также можно измерять, например, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Помимо исследований токсичности эффективную дозу также можно оценивать на основании количества белка MASP-2, присутствующего у живого субъекта, и аффинности связывания ингибирующего MASP-2 средства. Показано, что уровни MASP-2 у нормальных субъектов-людей в сыворотке являются низкими, в пределах 500 нг/мл, и уровни MASP-2 у конкретного субъекта можно определять с использованием количественного анализа на MASP-2, описанного в публикации Moller-Kristensen M., et al., J. Immunol. Methods 282:159-167, 2003.

Как правило, доза введенных композиций, содержащих ингибирующие MASP-2 средства, варьируется в зависимости от таких факторов, как возраст, масса тела, рост, пол, общее состояние здоровья и предшествующая история болезней субъекта. В качестве иллюстрации, ингибирующие MASP-2 средства, такие как анти-MASP-2 антитела, можно вводить в диапазонах доз примерно 0,010-10,0 мг/кг, предпочтительно 0,010-1,0 мг/кг, более предпочтительно 0,010-0,1 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит сочетание анти-MASP-2 антител и ингибирующих MASP-2 пептидов.

Терапевтическую эффективность ингибирующих MASP-2 композиций и способов по настоящему изобретению у конкретного субъекта, и соответствующие дозы, можно определять в анализах комплемента, хорошо известных специалистам в данной области. Активация комплемента приводит к образованию множества специфических продуктов. В течение последнего десятилетия были разработаны чувствительные и специфические анализы, которые коммерчески доступны для большинства этих продуктов активации, включая малые фрагменты активации C3a, C4a, и C5a, а также крупные фрагменты активации iC3b, C4d, Bb и sC5b-9. В большинстве из этих анализов используют моноклональные антитела, которые реагируют с новыми антигенами (неоантигенами),

экспонированными на фрагменте, но не на нативных белках, из которых они образуются, что делает эти анализы очень простыми и специфическими. В большинстве из них используют технологию ELISA, хотя иногда все еще используют радиоиммунный анализ для C3a и C5a. В этих последних анализах определяют как не процессированные фрагменты, так и их «дезArg» фрагменты, которые представляют собой основные формы, встречающиеся в системе кровообращения. Не процессированные фрагменты и $C5a_{дезArg}$ быстро выводятся за счет связывания с клеточными поверхностными рецепторами и, вследствие этого, присутствуют в очень низких концентрациях, в то время как $C3a_{дезArg}$ не связывается с клетками и накапливается в плазме. Измерение уровня C3a представляет собой чувствительный независимый от пути показатель активации комплемента. Активацию альтернативного пути можно оценивать путем определения фрагмента Bb. Определение жидкофазного продукта атаки мембран в результате пути активации, sC5b-9, является доказательством того, что комплемент активируется до завершения. Поскольку как в лектиновом, так и в классическом, путях образуются одинаковые продукты активации, C4a и C4d, определение этих двух фрагментов не позволяет устанавливать, какой из этих двух путей привел к образованию продуктов активации.

Ингибирование MASP-2-зависимой активации комплемента характеризуется по меньшей мере одним из следующих изменений в компонентах системы комплемента, которые происходят в результате введения ингибирующего MASP-2 средства в соответствии со способами по изобретению: ингибирование образования или продуцирования продуктов MASP-2-зависимой активации комплемента, C4b, C3a, C5a и/или C5b-9 (MAC) (измеряемое, например, как описано в примере 2), уменьшение расщепления C4 и отложения C4b (измеряемое, например, как описано в примере 10) или уменьшение расщепления C3 и отложения C3b (измеряемое, например, как описано в примере10).

Дополнительные средства

Композиции и способы, включающие ингибирующие MASP-2 средства, могут, необязательно, включать одно или более дополнительных лекарственных средств, которые могут повышать активность ингибирующего MASP-2 средства или которые выполняют связанные терапевтические функции аддитивным или синергетическим образом. Например, в контексте лечения субъекта, страдающего от TTP, когда субъект имеет положительный результат анализа на ингибитор ADAM-TS13, одно или более ингибирующих MASP-2 средств можно вводить в сочетании (включая совместное введение) с одним или более иммунодепрессантами. Подходящие иммунодепрессанты включают: кортикостероиды, ритуксан, циклоспорин и тому подобное. В контексте лечения субъекта, страдающего от, или имеющего риск развития, HUS или aHUS, одно или более ингибирующих MASP-2 средств можно вводить в сочетании (включая совместное введение) с соответствующим антибиотиком. В контексте лечения субъекта, страдающего от, или имеющего риск развития, aHUS, одно или более ингибирующих MASP-2 средств можно вводить в сочетании (включая совместное введение) с другими

ингибирующими комплемент средствами, такими как экулизумаб (солирис), TT-30, антитело к фактору B, или другие средства, которые ингибируют терминальные компоненты комплемента или амплификацию альтернативного пути.

Включение и выбор дополнительного средства(средств) будет зависеть от желаемого терапевтического результата. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 средство можно вводить в сочетании с одним или более противовоспалительными и/или анальгетическими средствами. Подходящие противовоспалительные и/или анальгетические средства включают: антагонисты серотониновых рецепторов; агонисты серотониновых рецепторов; антагонисты гистаминовых рецепторов; антагонисты брадикининовых рецепторов; ингибиторы калликреина; антагонисты тахикининовых рецепторов, включая антагонисты подтипов рецепторов нейрокинина$_1$ и нейрокинина$_2$; антагонисты рецепторов пептида, связанного с геном кальцитонина (CGRP); антагонисты интерлейкиновых рецепторов; ингибиторы ферментов, активных в путях синтеза метаболитов арахидоновой кислоты, включая ингибиторы фосфолипазы, в том числе ингибиторы изоформы PLA_2 и ингибиторы изоформы PLC_γ, ингибиторы циклооксигеназы (COX) (которые могут представлять собой ингибиторы либо COX-1, COX-2, либо неизбирательные ингибиторы COX-1 и -2), ингибиторы липооксигеназы; антагонисты простаноидных рецепторов, включая антагонисты подтипов рецепторов эйкозаноидов EP-1 и EP-4 и антагонисты подтипов рецепторов тромбоксана; антагонисты лейкотриеновых рецепторов, включая антагонисты подтипов рецепторов лейкотриена B_4 и антагонисты подтипов рецепторов лейкотриена D_4; агонисты опиоидных рецепторов, включая агонисты подтипов рецепторов μ-опиоидов, δ-опиоидов и κ-опиоидов; агонисты и антагонисты пуринергических рецепторов, включая антагонисты рецепторов P_{2X} и агонисты рецепторов P_{2Y}; активаторы аденозинтрифосфат (АТФ)-зависимых калиевых каналов; ингибиторы MAP-киназы; ингибиторы никотиновых ацетилхолиновых рецепторов и агонисты альфа-адренергических рецепторов (включая агонисты альфа-1, альфа-2, а также неизбирательные агонисты альфа-1 и 2 рецепторов).

Ингибирующие MASP-2 средства по настоящему изобретению также можно вводить в сочетании с одним или более другими ингибиторами комплемента, такими как ингибитор C5. В настоящее время экулизумаб (солирис®), антитело против C5, является единственным направленным на комплемент лекарственным средством, которое было одобрено для лечения людей. Однако некоторые фармакологические средства, как показано, блокируют комплемент in vivo. K76COOH и нафамостат мезилат представляют собой два средства, которые, как показано, имеют некоторую эффективность в животных моделях трансплантации (Miyagawa, S., et al., Transplant Proc. 24:483-484, 1992). Низкомолекулярные гепарины также, как показано, являются эффективными в регуляции активности комплемента (Edens, R.E., et al., Complement Today, pp. 96-120, Basel: Karger, 1993). Считается, что эти низкомолекулярные ингибиторы могут быть полезными в качестве средств, используемых в сочетании с ингибирующими MASP-2 средствами по настоящему изобретению.

Другие природные ингибиторы комплемента могут быть использованы в сочетании с ингибирующими MASP-2 средствами по настоящему изобретению. Биологические ингибиторы комплемента включают растворимый фактор комплемента 1 (sCR1). Он представляет собой природный ингибитор, который присутствует на наружных мембранах человеческих клеток. Другие мембранные ингибиторы включают DAF, MCP и CD59. Рекомбинантные формы были протестированы на их активность против комплемента in vitro и in vivo. Показано, что sCR1 является эффективным при ксенотрансплантации, когда система комплемента (как альтернативная, так и классическая) создает триггер для синдрома гиперактивного отторжения в пределах нескольких минут после перфузии крови через только что трансплантированный орган (Platt, J.L., et al., Immunol. Today 11:450-6, 1990; Marino, I.R., et al., Transplant Proc. 1071:6, 1990; Johnstone, P.S., et al., Transplantation 54:573-6, 1992). Использование sCR1 обеспечивает защиту и продлевает срок выживания трансплантированного органа, указывая на участие пути комплемента в патогенезе отторжения органа (Leventhal, J.R., et al., Transplantation 55:857-66, 1993; Pruitt, S.K., et al., Transplantation 57:363-70, 1994).

Подходящие дополнительные ингибиторы комплемента для использования в сочетании с композициями по настоящему изобретению также включают, в качестве примера, моАт, такие как анти-C5 антитело (например, экулизумаб), разрабатываемое Alexion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut, и моАт против пропердина.

Фармацевтические носители и среды для доставки

Как правило, композиции ингибирующего MASP-2 средства по настоящему изобретению, в сочетании с любыми другими выбранными терапевтическими средствами, содержатся в фармацевтически приемлемом носителе. Носитель является нетоксичным, биосовместимым и выбранным таким образом, чтобы не оказывать отрицательного влияния на биологическую активность ингибирующего MASP-2 средства (и любых других терапевтических средств, объединенных с ним). Иллюстративные фармацевтически приемлемые носители для пептидов описаны в патенте США № 5211657, выданном Yamada. Анти-MASP-2 антитела и ингибирующие пептиды, полезные по изобретению, могут быть сформулированы в препараты в твердой, полутвердой, гелевой, жидкой или газообразной формах, таких как таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази, растворы, депо, ингаляционные и инъекционные препараты, используемые для перорального, парентерального или хирургического введения. По изобретению также предусмотрено локальное введение композиций путем нанесения на медицинские устройства и тому подобное.

Подходящие носители для парентеральной доставки путем инъекции, инфузии или орошения, а также топической доставки, включают дистиллированную воду, физиологический фосфатно-солевой буфер, нормальный раствор Рингера или раствор Рингера лактат, раствор декстрозы, раствор Хенка или пропандиол. Кроме того, в качестве растворителя или суспензионной среды можно использовать стерильные нелетучие масла. Для этой цели можно использовать любое биосовместимое масло, включая синтетические

моно- или диглицериды. Кроме того, в изготовлении инъекционных препаратов используют жирные кислоты, такие как олеиновая кислота. Носитель и средство можно формулировать в виде жидкости, суспензии, полимеризуемого или не полимеризуемого геля, пасты или мази.

Носитель также может включать среду для доставки, предназначенную для поддержания (то есть, продления, отсрочки или регуляции) доставки средства(средств) или для улучшения доставки, поглощения, стабильности или фармакокинетики терапевтического средства(средств). Такие среды для доставки могут включать, в качестве неограничивающего примера, микрочастицы, микросферы, наносферы или наночастицы, состоящие из белков, липосом, углеводов, синтетических органических соединений, неорганических соединений, полимерных или сополимерных гидрогелей и полимерных мицелл. Подходящие гидрогелевые и мицеллярные системы доставки включают сополимеры PEO:PHB:PEO и сополимеры/циклодекстриновые комплексы, раскрытые в WO 2004/009664 A2, а также PEO и PEO/циклодекстриновые комплексы, раскрытые в публикации патентной заявки США № 2002/0019369 A1. Такие гидрогели можно вводить инъекцией локально в участок запланированного действия или подкожно, или внутримышечно, с целью формирования депо для замедленного высвобождения.

Для внутрисуставной доставки ингибирующее MASP-2 средство может находиться в вышеописанных жидких или гелевых носителях, которые можно вводить инъекцией, вышеописанных средах для доставки с замедленным высвобождением, которые можно вводить инъекцией, или в гиалуроновой кислоте или производном гиалуроновой кислоты.

Для перорального введения не пептидергических средств ингибирующее MASP-2 средство может находиться в инертном наполнителе или разбавителе, таком как сахароза, кукурузный крахмал или целлюлоза.

Для топического введения ингибирующее MASP-2 средство может находиться в мази, лосьоне, креме, геле, каплях, суппозитории, аэрозоле, жидкости или порошке, либо в гелевых или микрокапсульных системах доставки с использованием чрескожного пластыря.

Различные назальные и легочные системы доставки, включая аэрозоли, дозирующие ингаляторы, ингаляторы сухого порошка и небулайзеры, разработаны и могут быть успешно приспособлены для доставки препарата по настоящему изобретению в аэрозольной, ингаляционной или распыляемой среде для доставки, соответственно.

Для интратекальной (и/т) или интрацереброventрикулярной (и/цв) доставки препарата по настоящему изобретению можно использовать соответствующие стерильные системы доставки (например, жидкости; гели, суспензии и так далее).

Композиции по настоящему изобретению также могут включать биосовместимые эксципиенты, такие как диспергирующие или увлажняющие средства, суспендирующие средства, разбавители, буферы, усилители проникновения, эмульгаторы, связывающие вещества, загустители, вкусовые добавки (для перорального введения).

Фармацевтические носители для антител и пептидов

Более конкретно, в случае анти-MASP-2 антител и ингибирующих пептидов иллюстративные препараты можно вводить парентерально в виде инъекционных доз раствора или суспензии соединения в физиологически приемлемом разбавителе с фармацевтическим носителем, который может представлять собой стерильную жидкость, такую как вода, масла, солевой раствор, глицерин или этанол. Кроме того, в композициях, содержащих анти-MASP-2 антитела и ингибирующие пептиды, могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как увлажнители или эмульгаторы, сурфактанты, регулирующие pH вещества и тому подобное. Дополнительные компоненты фармацевтических композиций включают масла (например, животного, растительного или синтетического происхождения), например, соевое масло и минеральное масло. Как правило, гликоли, такие как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль, являются предпочтительными жидкими носителями для инъекционных растворов.

Анти-MASP-2 антитела и ингибирующие пептиды также можно вводить в форме инъекционного или имплантируемого депо-препарата, который может быть сформулирован так, чтобы обеспечивать замедленное или импульсное высвобождение активных средств.

Фармацевтически приемлемые носители для ингибиторов экспрессии

Более конкретно, в случае ингибиторов экспрессии, полезных в способах по изобретению, предложены композиции, которые содержат ингибитор экспрессии, описанный выше, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Композиция может дополнительно содержать коллоидную дисперсионную систему.

Фармацевтические композиции, содержащие ингибиторы экспрессии, могут включать, но без ограничения, растворы, эмульсии и содержащие липосомы препараты. Эти композиции можно создавать из различных компонентов, которые включают, но без ограничения, готовые жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. Изготовление таких композиций, как правило, включает объединение ингибитора экспрессии с одним или более из следующего: буферы, антиоксиданты, низкомолекулярные полипептиды, белки, аминокислоты, углеводы, включая глюкозу, сахарозу или декстрины, хелатирующие агенты, такие как ЭДТА, глутатион и другие стабилизаторы и эксципиенты. Нейтральный буферный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с неспецифическим сывороточным альбумином, являются примерами подходящих разбавителей.

В некоторых вариантах осуществления композиции можно готовить и формулировать в виде эмульсий, которые, как правило, представляют собой гетерогенные системы из одной жидкости, диспергированной в другой жидкости в виде капель (смотри, Idson, в: Pharmaceutical Dosage Forms, Vol. 1, Rieger и Banker (eds.), Marcek Dekker, Inc., N.Y., 1988). Примеры природных эмульгаторов, используемых в эмульсионных препаратах, включают гуммиарабик, пчелиный воск, ланолин, лецитин и фосфатиды.

В одном варианте осуществления композиции, содержащие нуклеиновые кислоты, могут быть сформулированы в виде микроэмульсий. Используемый в настоящем

документе термин «микроэмульсия» означает систему из воды, масла и амфифильного вещества, которая представляет собой один оптически изотропный и термодинамически стабильный жидкий раствор (смотри Rosoff в: Pharmaceutical Dosage Forms, Vol. 1). В способе по изобретению также можно использовать липосомы для переноса и доставки антисмысловых олигонуклеотидов в нужный участок.

Фармацевтические композиции и препараты ингибиторов экспрессии для топического введения могут включать чрескожные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Можно использовать общепринятые фармацевтические носители, а также водные, порошковые или масляные базы, загустители и тому подобное.

Способы введения

Фармацевтические композиции, содержащие ингибирующие MASP-2 средства, можно вводить различными способами в зависимости от того, является ли наиболее подходящим для подвергаемого лечению состояния локальный или системный способ введения. Кроме того, как описано выше в настоящем документе, в случае процедур экстракорпоральной реперфузии ингибирующие MASP-2 средства можно вводить путем введения композиций по настоящему изобретению в проходящую через систему рециркуляции кровь или плазму. Кроме того, композиции по настоящему изобретению можно доставлять путем нанесения, или включения, композиций на, или в, имплантируемое медицинское устройство.

Системная доставка

Используемые в настоящем документе термины «системная доставка» и «системное введение» должны включать, но не ограничиваться ими, пероральный и парентеральный пути введения, включая внутримышечный (в/м), подкожный, внутривенный (в/в), внутриартериальный, ингаляционный, подъязычный, трансбуккальный, топический, чрескожный, назальный, ректальный, вагинальный и другие пути введения, которые эффективно приводят к диспергированию доставляемого средства в одном или нескольких участках запланированного терапевтического действия. Терапевтические пути системной доставки для настоящих композиций включают внутривенный, внутримышечный, подкожный и ингаляционный. Следует понимать, что точный путь системного введения для конкретных используемых средств в конкретных композициях по настоящему изобретению будет зависеть частично от подверженности средства метаболическим путям трансформации, связанным с конкретным путем введения. Например, пептидергические средства наиболее предпочтительно вводить иными путями, чем пероральный путь введения.

Ингибирующие MASP-2 антитела и полипептиды можно доставлять субъекту, который нуждается в этом, любыми подходящими способами. Способы доставки анти-MASP-2 антител и полипептидов включают введение пероральным, легочным, парентеральным (например, внутримышечной, внутрибрюшинной, внутривенной (в/в) или подкожной инъекцией), ингаляционным (например, в виде препарата тонкодисперсного

порошка), чрескожным, назальным, вагинальным, ректальным или подъязычным путями введения, и они могут быть сформулированы в лекарственных формах, подходящих для каждого пути введения.

В качестве репрезентативного примера ингибирующие MASP-2 антитела и пептиды можно вводить в живой организм путем нанесения на телесные оболочки, способные абсорбировать полипептиды, например, оболочки носовой полости, желудочно-кишечного тракта и прямой кишки. Полипептиды, как правило, наносят на абсорбирующую оболочку в сочетании с усилителем проникновения. (Смотри, например, Lee, V.H.L., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys. 5:69, 1988; Lee, V.H.L., J. Controlled Release 13:213, 1990; Lee, V.H.L., Ed., Peptide and Protein Drug Delivery, Marcel Dekker, New York (1991); DeBoer, A.G., et al., J. Controlled Release 13:241, 1990.) Например, STDHF представляет собой синтетическое производное фусидовой кислоты, стероидный сурфактант, который аналогичен по структуре солям желчных кислот, и его используют в качестве усилителя проникновения для назальной доставки (Lee, W.A., Biopharm. 22, Nov./Dec. 1990).

Ингибирующие MASP-2 антитела и полипептиды можно вводить в сочетании с другой молекулой, такой как липид, для защиты полипептидов от ферментативного расщепления. Например, ковалентное присоединение полимеров, в частности, полиэтиленгликоля (ПЭГ), было использовано для защиты определенных белков от ферментативного гидролиза в организме и, за счет этого, продления периода полувыведения (Fuertges, F., et al., J. Controlled Release 11:139, 1990). Описаны многие полимерные системы для доставки белков (Bae, Y.H., et al., J. Controlled Release 9:271, 1989; Hori, R., et al., Pharm. Res. 6:813, 1989; Yamakawa, I., et al., J. Pharm. Sci. 79:505, 1990; Yoshihiro, I., et al., J. Controlled Release 10:195, 1989; Asano, M., et al., J. Controlled Release 9:111, 1989; Rosenblatt, J., et al., J. Controlled Release 9:195, 1989; Makino, K., J. Controlled Release 12:235, 1990; Takakura, Y., et al., J. Pharm. Sci. 78:117, 1989; Takakura, Y., et al., J. Pharm. Sci. 78:219, 1989).

Недавно были разработаны липосомы с повышенной стабильностью в сыворотке и более длительным периодом полувыведения из системы кровообращения (смотри, например, патент США № 5741516, выданный Webb). Кроме того, описаны различные способы использования липосом и подобных липосомам препаратов в качестве потенциальных носителей для лекарственного средства (смотри, например, патент США № 5567434, выданный Szoka; патент США № 5552157, выданный Yagi; патент США № 5565213, выданный Nakamori; патент США № 5738868, выданный Shinkarenko; и патент США № 5795587, выданный Gao).

Для чрескожных применений ингибирующие MASP-2 антитела и полипептиды можно объединять с другими подходящими ингредиентами, такими как носители и/или адъюванты. В отношении природы таких других ингредиентов ограничения отсутствуют, за исключением того, что они должны быть фармацевтически приемлемыми для их запланированного введения, и не должны снижать активность активных ингредиентов

композиции. Примеры подходящих сред включают мази, кремы, гели или суспензии, с добавлением, или без добавления, очищенного коллагена. Ингибирующими MASP-2 антителами и полипептидами также можно пропитывать чрескожные пластыри, повязки и перевязочные средства, предпочтительно в жидкой или полужидкой форме.

Композиции по настоящему изобретению можно системно вводить на периодической основе, с интервалами, определенными для поддержания желаемого уровня терапевтического эффекта. Например, композиции можно вводить, к примеру, подкожной инъекцией, каждые две-четыре недели, или менее часто. Режим дозирования будет определять врач с учетом различных факторов, которые могут влиять на действие сочетания средств. Такие факторы будут включать степень прогрессирования состояния, подвергаемого лечению, возраст, пол и массу тела пациента, а также другие клинические факторы. Доза каждого отдельного средства будет варьироваться в зависимости от ингибирующего MASP-2 средства, которое включено в композицию, а также от наличия и природы любой среды для доставки лекарственного средства (например, среды для доставки с замедленным высвобождением). Кроме того, количество дозы можно корректировать в зависимости от частоты введения и фармакокинетики доставляемого средства(средств).

Локальная доставка

Используемый в настоящем документе термин «локальная» доставка означает применение лекарственного средства непосредственно в участке планируемого локализованного действия, или вблизи него, и может включать, например, топическую доставку на кожу или другие пораженные ткани, офтальмическую доставку, интратекальное (и/т), интрацеребровентрикулярное (и/цв), внутрисуставное, внутриполостное, интракраниальное или внутрипузырное введение, размещение или орошение. Локальное введение может быть предпочтительным для возможности введения более низкой дозы, во избежание системных побочных эффектов и для более точного контроля времени доставки и концентрации активных средств в зоне локальной доставки. Локальное введение обеспечивает известную концентрацию в целевом участке, независимо от различий у пациентов метаболизма, кровотока и так далее. Лучшее контролирование дозы также обеспечивается при прямом способе доставки.

Локальную доставку ингибирующего MASP-2 средства можно осуществлять в контексте хирургических методов лечения заболевания или состояния, например, в процессе таких процедур, как артериальное шунтирование, атерэктомия, лазерные процедуры, ультразвуковые процедуры, баллонная ангиопластика и установка стента. Например, ингибитор MASP-2 можно вводить субъекту в сочетании с процедурой баллонной ангиопластики. Процедура баллонной ангиопластики включает введение катетера со спущенным баллоном в артерию. Спущенный баллон помещают вблизи атеросклеротической бляшки и надувают, так что бляшка прижимается к стенке сосуда. В результате поверхность баллона находится в контакте со слоем клеток сосудистого эндотелия на поверхности кровеносного сосуда. Ингибирующее MASP-2 средство можно

соединять с катетером для баллонной ангиопластики таким образом, который допускает высвобождение средства в зоне атеросклеротической бляшки. Средство можно соединять с катетером для баллонной ангиопластики стандартными методами, известными в данной области. Например, средство можно хранить в компартменте баллонного катетера до раздувания баллона, после чего оно высвобождается в локальную среду. Альтернативно, средством можно пропитывать поверхность баллона так, что оно вступает в контакт с клетками артериальной стенки по мере раздувания баллона. Средство также можно доставлять в перфорированном баллонном катетере, таком как те, которые описаны в Flugelman, M.Y., et al., Circulation 85:1110-1117, 1992. Смотри опубликованную PCT заявку WO 95/23161 для описания иллюстративной процедуры присоединения терапевтического белка к катетеру для баллонной ангиопластики. Аналогично, ингибирующее MASP-2 средство можно включать в гель или полимерное покрытие, нанесенное на стент, или можно включать в материал стента, в результате чего стент выпускает ингибирующее MASP-2 средство после его размещения в сосуде.

Ингибирующие MASP-2 композиции, используемые в лечении артрита и других скелетно-мышечных заболеваний, можно локально доставлять внутрисуставной инъекцией. Такие композиции, предпочтительно, могут содержать среду для доставки с замедленным высвобождением. В качестве дополнительного примера случаев, в которых может быть желательной локальная доставка, ингибирующие MASP-2 композиции, используемые в лечении заболеваний мочеполовой системы, можно вводить по каплям в мочевой пузырь или в другой отдел мочеполовой системы.

Покрытия на медицинских устройствах

Ингибирующие MASP-2 средства, такие как антитела и ингибирующие пептиды, могут быть иммобилизованы на (или внутри) поверхности имплантируемого или прикрепляемого медицинского устройства. Модифицированная поверхность, как правило, будет находиться в контакте с живой тканью после имплантации в тело животного. «Имплантируемое или прикрепляемое медицинское устройство» означает любое устройство, которое имплантируют, или прикрепляют, в ткань тела животного, для нормального функционирования устройства (например, стенты и имплантируемые устройства для доставки лекарственного средства). Такие имплантируемые или прикрепляемые медицинские устройства могут быть выполнены, например, из нитроцеллюлозы, диазоцеллюлозы, стекла, полистирола, поливинилхлорида, полипропилена, полиэтилена, декстрана, сефарозы, агара, крахмала, нейлона, нержавеющей стали, титана и биоразлагаемых и/или биосовместимых полимеров. Связывание белка с устройством можно осуществлять любым методом, который не приводит к нарушению биологической активности связанного белка, например, путем присоединения одного или обоих из N- и C-концевых остатков белка к устройству. Присоединение также можно выполнять через один или более внутренних сайтов белка. Также можно использовать несколько участков присоединения (как внутри, так и на концах белка). Поверхность имплантируемого или прикрепляемого медицинского

устройства можно модифицировать для включения функциональных групп (например, карбоксильных, амидных, аминогрупп, эфирных, гидроксильных, циано, нитридо, сульфанамидо, ацетильных, эпоксидных, силановых, ангидридных, сукцинимидных, азидо) для иммобилизации на них белка. Химические реакции связывания включают, но без ограничения, образование сложных эфиров, простых эфиров, амидов, азидо- и сульфанамидо- производных, цианатов и других связей с функциональными группами, доступными на анти-MASP-2 антителах или ингибирующих пептидах. Анти-MASP-2 антитела или ингибирующие фрагменты также можно присоединять не ковалентно за счет добавления к белку последовательности аффинной метки, такой как GST (D.B. Smith and K.S. Johnson, Gene 67:31, 1988), полигистидинового фрагмента (E. Hochuli et al., J. Chromatog. 411:77, 1987) или биотина. Такие аффинные метки можно использовать для обратимого присоединения белка к устройству.

Белки также можно ковалентно присоединять к поверхности корпуса устройства, например, за счет ковалентной активации поверхности медицинского устройства. В качестве репрезентативного примера, белок(ки) внеклеточного матрикса можно присоединять к корпусу устройства с использованием любой из следующих пар реакционноспособных групп (один член пары находится на поверхности корпуса устройства, и другой член пары находится на белке(ках) внеклеточного матрикса: гидроксил/карбоновая кислота для образования сложноэфирной связи; гидроксил/ангидрид для образования сложноэфирной связи; гидроксил/изоцианат для образования уретановой связи. Поверхность корпуса устройства, которая не имеет полезных реакционноспособных групп, можно обрабатывать плазмой, образуемой высокочастотным разрядом (RFGD), выполняя травление для создания реакционноспособных групп, способствующих отложению белка(ков) внеклеточного матрикса (например, обрабатывать кислородной плазмой для введения кислород-содержащих групп; обрабатывать пропиламиновой плазмой для введения аминогрупп).

Ингибирующие MASP-2 средства, включающие молекулы нуклеиновой кислоты, например, антисмысловой, РНКи или ДНК, кодирующей пептидные ингибиторы, можно погружать в пористые матрицы, присоединенные к корпусу устройства. Репрезентативными пористыми матрицами, которые можно использовать для создания поверхностного слоя, являются матрицы, полученные из коллагена сухожилий и кожи, которые можно получать из множества коммерческих источников (например, Sigma и Collagen Corporation), или коллагеновые матрицы, полученные, как описано в патентах США № 4394370, выданном Jefferies, и 4975527, выданном Koezuka. Один коллагеновый материал называется UltraFiber™ и доступен от компании Norian Corp. (Mountain View, California).

Также при необходимости можно использовать некоторые полимерные матрицы, которые содержат акриловые сложноэфирные полимеры и полимеры молочной кислоты, как описано, например, в патентах США № 4526909 и 4563489, выданных Urist. Конкретными примерами полезных полимеров являются полимеры ортоэфиров,

ангидридов, пропилен-фумаратов, или полимер из мономеров одной или более α-гидроксикарбоновых кислот (например, α-гидроксиуксусной кислоты (гликолевой кислоты) и/или α-гидроксипропионовой кислоты (молочной кислоты)).

Режимы лечения

В случае профилактического применения фармацевтические композиции вводят субъекту, предрасположенному, или по иной причине имеющему риск развития состояния, связанного с MASP-2-зависимой активацией комплемента, в количестве, достаточном для устранения или уменьшения риска развития симптомов состояния. В случае терапевтического применения фармацевтические композиции вводят субъекту, который предположительно или фактически страдает от состояния, связанного с MASP-2-зависимой активацией комплемента, в терапевтически эффективном количестве, достаточном для облегчения или по меньшей мере частичного уменьшения симптомов состояния. Как в профилактическом, так и в терапевтическом, режимах композиции, содержащие ингибирующие MASP-2 средства, можно вводить в нескольких дозах до достижения достаточного терапевтического результата у субъекта. Применение ингибирующих MASP-2 композиций по настоящему изобретению можно выполнять путем однократного введения композиции или путем ограниченного количества последовательных введений для лечения острого состояния, например, реперфузионного повреждения или другого травматического повреждения. Альтернативно, композицию можно вводить с периодическими интервалами в течение длительного периода времени для лечения хронических состояний, например, артритов или псориаза.

Способы и композиции по настоящему изобретению можно использовать для ингибирования воспаления и связанных процессов, которые, как правило, возникают в результате диагностических и терапевтических медицинских и хирургических процедур. Для ингибирования таких процессов ингибирующую MASP-2 композицию по настоящему изобретению можно применять перипроцедурно. Используемый в настоящем документе термин «перипроцедурно» относится к введению ингибирующей композиции препроцедурно и/или интрапроцедурно, и/или постпроцедурно, то есть, до процедуры, до и в процессе процедуры, до и после процедуры, до, в процессе и после процедуры, в процессе процедуры, в процессе и после процедуры или после процедуры. Перипроцедурное применение можно осуществлять путем локального введения композиции в участок проведения операции или процедуры, например, путем инъекции, либо непрерывного или прерывистого орошения участка, либо путем системного введения. Соответствующие способы локальной периоперационной доставки растворов ингибирующего MASP-2 средства описаны в патентах США № 6420432, выданном Demopulos, и № 6645168, выданном Demopulos. Соответствующие способы локальной доставки хондропротективных композиций, содержащих ингибирующее MASP-2 средство(а), описаны в международной PCT патентной заявке WO 01/07067 A2. Соответствующие способы и композиции для направленной системной доставки хондропротективных композиций, содержащих ингибирующее MASP-2 средство(а),

описаны в международной PCT патентной заявке WO 03/063799 A2.

В одном аспекте изобретения фармацевтические композиции вводят субъекту, страдающему от, или имеющему риск развития, тромботической микроангиопатии (TMA). В одном варианте осуществления TMA выбирают из группы, состоящей из гемолитического уремического синдрома (HUS), тромботической тромбоцитопенической пурпуры (TTP) и атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS). В одном варианте осуществления TMA представляет собой aHUS. В одном варианте осуществления композицию вводят пациенту с aHUS во время острой фазы заболевания. В одном варианте осуществления композицию вводят пациенту с aHUS во время фазы ремиссии (то есть, субъекту, который восстановился, или частично восстановился, после эпизода острой фазы aHUS, при этом на ремиссию указывает, например, повышение количества тромбоцитов и/или снижение сывороточных концентраций LDH, например, как описано в публикации Loirat C et al., Orphanet Journal of Rare Diseases 6:60, 2011, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки). В одном варианте осуществления субъект страдает от, или имеет риск развития, TMA, которая представляет собой (i) TMA вследствие рака; (ii) TMA вследствие химиотерапии или (iii) TMA вследствие трансплантации (например, трансплантации органа, например, трансплантации почки или трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток). В одном варианте осуществления субъект страдает от, или имеет риск развития, синдрома Апшо-Шульмана (USS). В одном варианте осуществления субъект страдает от, или имеет риск развития, болезни Дегоса. В одном варианте осуществления субъект страдает от, или имеет риск развития, катастрофического антифосфолипидного синдрома (CAPS). В случае терапевтического применения фармацевтические композиции вводят субъекту, страдающему от, или имеющему риск развития, TMA, в терапевтически эффективном количестве, достаточном для ингибирования образования тромбов, облегчения или по меньшей мере частичного уменьшения симптомов состояния.

Как в профилактическом, так и в терапевтическом, режимах композиции, содержащие ингибирующие MASP-2 средства, можно вводить в нескольких дозах до достижения достаточного терапевтического результата у субъекта. В одном варианте осуществления изобретения ингибирующее MASP-2 средство представляет собой анти-MASP-2 антитело, которое предпочтительно можно вводить взрослому пациенту (например, взрослому пациенту со средней массой тела 70 кг) в дозе от 0,1 мг до 10000 мг, более предпочтительно от 1,0 мг до 5000 мг, более предпочтительно от 10,0 мг до 2000 мг, более предпочтительно от 10,0 мг до 1000 мг и еще более предпочтительно от 50,0 мг до 500 мг. Для малолетних пациентов дозу можно корректировать пропорционально массе тела пациента. Применение ингибирующих MASP-2 композиций по настоящему изобретению можно выполнять путем однократного введения композиции или путем ограниченного количества последовательных введений для лечения TMA. Альтернативно, композицию можно вводить с периодическими интервалами, например, ежедневно, два раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или раз в два месяца, в течение

длительного периода времени для лечения ТМА.

В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий от, или имеющий риск развития, ТМА, получал ранее, или получает в настоящее время, лечение ингибитором терминального компонента комплемента, который ингибирует расщепление белка С5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции по изобретению, содержащей ингибитор MASP-2, и дополнительное введение субъекту ингибитора терминального компонента комплемента, который ингибирует расщепление белка С5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления ингибитор терминального компонента комплемента представляет собой гуманизированное анти-С5 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ингибитор терминального компонента комплемента представляет собой экулизумаб.

В одном аспекте изобретения фармацевтические композиции вводят субъекту, предрасположенному, или по иной причине имеющему риск развития aHUS, в количестве, достаточном для устранения или уменьшения риска развития симптомов состояния. В случае терапевтического применения фармацевтические композиции вводят субъекту, который предположительно или фактически страдает от aHUS, в терапевтически эффективном количестве, достаточном для облегчения или по меньшей мере частичного уменьшения симптомов состояния. В одном аспекте изобретения перед введением субъект может быть обследован для определения того, имеет ли субъект один или более симптомов aHUS, включая (i) анемию, (ii) тромбоцитопению, (iii) почечную недостаточность и (iv) повышенный уровень креатинина, и затем композицию по настоящему изобретению вводят в эффективном количестве и в течение достаточного периода времени для ослабления этого симптома(ов).

В другом аспекте изобретения ингибирующие MASP-2 композиции по настоящему изобретению можно использовать для профилактического введения субъекту, который имеет повышенный риск развития aHUS, и за счет этого уменьшения вероятности того, что у субъекта разовьется aHUS. Наличие у субъекта генетического маркера, который, как известно, ассоциирован с aHUS, сначала определяют путем проведения генетического скрининга образца, полученного от субъекта, и определения наличия по меньшей мере одного генетического маркера, связанного с aHUS: фактора H комплемента (CFH), фактора I (CFI), фактора B (CFB), мембранного кофактора CD46, C3, связанного с сфактором H комплемента белка (CFHR1), антикоагулянтного белка тромбомодулина (THBD), связанного с фактором H комплемента белка 3 (CFHR3) и связанного с фактором H комплемента белка 4 (CFHR4). Затем проводят периодический (например, ежемесячно, ежеквартально, дважды в год или ежегодно) мониторинг субъекта для определения наличия или отсутствия по меньшей мере одного симптома aHUS, такого как анемия, тромбоцитопения, почечная недостаточность и повышенный уровень креатинина. После определения наличия по меньшей мере одного из этих симптомов субъекту может быть введено ингибирующее MASP-2 средство, эффективное для ингибирования MASP-2-

зависимой активации комплемента, в эффективном количестве и в течение достаточного периода времени для ослабления указанных одного или более симптомов. В следующем аспекте настоящего изобретения можно проводить мониторинг субъекта, имеющего повышенный риск развития aHUS, как установлено после проведения скрининга и определения наличия одного из генетических маркеров, связанных с aHUS, в отношении возникновения события, которое, как известно, связано с инициированием клинических симптомов aHUS, включая воздействие лекарственного средства, инфекцию (например, бактериальную инфекцию), злокачественное новообразование, травму, трансплантацию органа или ткани и беременность.

В следующем аспекте настоящего изобретения композицию, содержащую количество ингибирующего MASP-2 средства, эффективное для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента, можно вводить субъекту, страдающему от, или имеющему риск развития, атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS) вследствие инфекции. Например, пациента, страдающего от, или имеющего риск развития, не энтерального aHUS, связанного с инфекцией, вызываемой S. pneumonia, можно лечить композициями по настоящему изобретению.

В следующем аспекте настоящего изобретения субъекта, страдающего от aHUS, сначала можно лечить ингибирующей MASP-2 композицией по настоящему изобретению, которую вводят через установленный катетер, например, установленный внутривенный катетер или установленный подкожный катетер, в течение первого периода времени, такого как один час, двенадцать часов, один день, два дня или три дня. Затем субъекта можно лечить в течение второго периода времени ингибирующей MASP-2 композицией, вводимой обычными подкожными инъекциями, например, ежедневно, два раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или раз в два месяца.

В следующем аспекте настоящего изобретения ингибирующую MASP-2 композицию по настоящему изобретению можно вводить субъекту, страдающему от aHUS, без плазмафереза (то есть, субъекту, чьи симптомы aHUS не лечили плазмаферезом и не лечат плазмаферезом в период лечения ингибирующей MASP-2 композицией), во избежание потенциальных осложнений плазмафереза, включающих кровотечение, инфицирование и воздействие болезнетворных и/или аллергических факторов, присутствующих в плазме донора, или в случае субъекта, отвергающего плазмаферез, или в условиях, когда плазмаферез недоступен.

В следующем аспекте настоящего изобретения ингибирующую MASP-2 композицию по настоящему изобретению можно вводить субъекту, страдающему от aHUS, в сочетании с лечением пациента плазмаферезом. Например, субъекту, получающему лечение плазмаферезом, затем можно вводить ингибирующую MASP-2 композицию, после проведения, или поочередно с проведением, плазмафереза.

В следующем аспекте настоящего изобретения можно проводить мониторинг субъекта, страдающего от, или имеющего риск развития, aHUS и получающего лечение ингибирующей MASP-2 композицией по настоящему изобретению, определяя

периодически, например, каждые двенадцать часов или ежедневно, уровень по меньшей мере одного фактора комплемента, при этом определение сниженного уровня по меньшей мере одного фактора комплемента в сравнении со стандартным значением, или значением у здорового контрольного субъекта, указывает на необходимость продолжения лечения композицией.

Как в профилактическом, так и в терапевтическом, режимах композиции, содержащие ингибирующие MASP-2 средства, можно вводить в нескольких дозах до достижения достаточного терапевтического результата у субъекта. В одном варианте осуществления изобретения ингибирующее MASP-2 средство представляет собой анти-MASP-2 антитело, которое предпочтительно можно вводить взрослому пациенту (например, взрослому пациенту со средней массой тела 70 кг) в дозе от 0,1 мг до 10000 мг, более предпочтительно от 1,0 мг до 5000 мг, более предпочтительно от 10,0 мг до 2000 мг, более предпочтительно от 10,0 мг до 1000 мг и еще более предпочтительно от 50,0 мг до 500 мг. Для малолетних пациентов дозу можно корректировать пропорционально массе тела пациента. Применение ингибирующих MASP-2 композиций по настоящему изобретению можно выполнять путем однократного введения композиции или путем ограниченного количества последовательных введений для лечения aHUS. Альтернативно, композицию можно вводить с периодическими интервалами, например, ежедневно, два раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или раз в два месяца, в течение длительного периода времени для лечения aHUS.

В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий от aHUS, получал ранее, или получает в настоящее время, лечение ингибитором терминального компонента комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции по изобретению, содержащей ингибитор MASP-2, и дополнительное введение субъекту ингибитора терминального компонента комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления ингибитор терминального компонента комплемента представляет собой гуманизированное анти-C5 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ингибитор терминального компонента комплемента представляет собой экулизумаб.

В одном аспекте изобретения фармацевтические композиции вводят субъекту, предрасположенному, или по иной причине имеющему риск развития HUS, в количестве, достаточном для устранения или уменьшения риска развития симптомов состояния. В случае терапевтического применения фармацевтические композиции вводят субъекту, который предположительно или фактически страдает от HUS, в терапевтически эффективном количестве, достаточном для облегчения или по меньшей мере частичного уменьшения симптомов состояния.

В другом аспекте настоящего изобретения вероятность развития нарушения почечной функции у субъекта, имеющего риск развития HUS, можно уменьшать путем введения субъекту ингибирующей MASP-2 композиции по настоящему изобретению в

количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. Например, субъект, имеющий риск развития HUS и подлежащий лечению ингибирующей MASP-2 композицией по настоящему изобретению, может иметь один или более симптомов, связанных с HUS, включая диарею, уровень гематокрита ниже 30% с признаками внутрисосудистого разрушения эритроцитов в мазке крови, тромбоцитопению и повышенные уровни креатинина. В качестве следующего примера, субъект, имеющий риск развития HUS и подлежащий лечению ингибирующей MASP-2 композицией по настоящему изобретению, может быть инфицирован E. coli, Shigella или Salmonella. Таких субъектов, инфицированных E. coli, Shigella или Salmonella, можно лечить ингибирующей MASP-2 композицией по настоящему изобретению в сочетании с лечением антибиотиком или, альтернативно, можно лечить ингибирующей MASP-2 композицией без одновременного лечения антибиотиком, в частности, в случае энтерогенной E. coli, при которой использование антибиотиков противопоказано. Субъект, инфицированный энтерогенной E. coli, который получал лечение антибиотиком, может иметь повышенный риск развития HUS, и его может быть предпочтительно лечить ингибирующей MASP-2 композицией по настоящему изобретению для снижения этого риска. Субъекта, инфицированного энтерогенной E. coli, можно лечить в течение первого периода времени ингибирующей MASP-2 композицией по настоящему изобретению без использования антибиотика, а затем в течение второго периода времени лечить как ингибирующей MASP-2 композицией по настоящему изобретению, так и антибиотиком.

В следующем аспекте настоящего изобретения субъекта, страдающего от HUS, сначала можно лечить ингибирующей MASP-2 композицией по настоящему изобретению, которую вводят через установленный катетер, например, установленный внутривенный катетер или установленный подкожный катетер, в течение первого периода времени, такого как один час, двенадцать часов, один день, два дня или три дня. Затем субъекта можно лечить в течение второго периода времени ингибирующей MASP-2 композицией, вводимой обычными подкожными инъекциями, например, ежедневно, два раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или раз в два месяца.

В следующем аспекте настоящего изобретения ингибирующую MASP-2 композицию по настоящему изобретению можно вводить субъекту, страдающему от HUS, без плазмафереза (то есть, субъекту, чьи симптомы HUS не лечили плазмаферезом и не лечат плазмаферезом в период лечения ингибирующей MASP-2 композицией), во избежание потенциальных осложнений плазмафереза, включающих кровотечение, инфицирование и воздействие болезнетворных и/или аллергических факторов, присутствующих в плазме донора, или в случае субъекта, отвергающего плазмаферез, или в условиях, когда плазмаферез недоступен.

В следующем аспекте настоящего изобретения ингибирующую MASP-2 композицию по настоящему изобретению можно вводить субъекту, страдающему от HUS, в сочетании с лечением пациента плазмаферезом. Например, субъекту, получающему лечение плазмаферезом, затем можно вводить ингибирующую MASP-2 композицию,

после проведения, или поочередно с проведением, плазмафереза.

В следующем аспекте настоящего изобретения можно проводить мониторинг субъекта, страдающего от, или имеющего риск развития, HUS и получающего лечение ингибирующей MASP-2 композицией по настоящему изобретению, определяя периодически, например, каждые двенадцать часов или ежедневно, уровень по меньшей мере одного фактора комплемента, при этом определение сниженного уровня по меньшей мере одного фактора комплемента в сравнении со стандартным значением, или значением у здорового контрольного субъекта, указывает на необходимость продолжения лечения композицией.

Как в профилактическом, так и в терапевтическом, режимах композиции, содержащие ингибирующие MASP-2 средства, можно вводить в нескольких дозах до достижения достаточного терапевтического результата у субъекта. В одном варианте осуществления изобретения ингибирующее MASP-2 средство представляет собой анти-MASP-2 антитело, которое предпочтительно можно вводить взрослому пациенту (например, взрослому пациенту со средней массой тела 70 кг) в дозе от 0,1 мг до 10000 мг, более предпочтительно от 1,0 мг до 5000 мг, более предпочтительно от 10,0 мг до 2000 мг, более предпочтительно от 10,0 мг до 1,000 мг, и еще более предпочтительно от 50,0 мг до 500 мг. Для малолетних пациентов дозу можно корректировать пропорционально массе тела пациента. Применение ингибирующих MASP-2 композиций по настоящему изобретению можно выполнять путем однократного введения композиции или путем ограниченного количества последовательных введений для лечения HUS. Альтернативно, композицию можно вводить с периодическими интервалами, например, ежедневно, два раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или раз в два месяца, в течение длительного периода времени для лечения HUS.

В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий от HUS, получал ранее, или получает в настоящее время, лечение ингибитором терминального компонента комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции по изобретению, содержащей ингибитор MASP-2, и дополнительное введение субъекту ингибитора терминального компонента комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления ингибитор терминального компонента комплемента представляет собой гуманизированное анти-C5 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ингибитор терминального компонента комплемента представляет собой экулизумаб.

В одном аспекте изобретения фармацевтические композиции вводят субъекту, предрасположенному, или по иной причине имеющему риск развития TTP, в количестве, достаточном для устранения или уменьшения риска развития симптомов состояния. В случае терапевтического применения фармацевтические композиции вводят субъекту, который предположительно или фактически страдает от TTP, в терапевтически эффективном количестве, достаточном для облегчения или по меньшей мере частичного

уменьшения симптомов состояния.

В другом аспекте настоящего изобретения субъекта, имеющего один или более из симптомов TTP, включая поражение центральной нервной системы, тромбоцитопению, тяжелое поражение сердца, тяжелое поражение легких, инфаркт кишечника и гангрену, можно лечить ингибирующей MASP-2 композицией по настоящему изобретению. В другом аспекте настоящего изобретения субъекта, имеющего, как определено, сниженный уровень ADAMTS-13, а также положительные результаты теста на наличие ингибитора (то есть, антитела) ADAMTS-13, можно лечить ингибирующей MASP-2 композицией по настоящему изобретению. В следующем аспекте настоящего изобретения субъекта, имеющего положительные результаты теста на наличие ингибитора ADAMTS-13, можно лечить иммунодепрессантом (например, кортикостероидами, ритуксаном или циклоспорином) одновременно с лечением ингибирующей MASP-2 композицией по настоящему изобретению. В следующем аспекте настоящего изобретения субъекта, имеющего, как определено, сниженный уровень ADAMTS-13, а также положительные результаты теста на наличие ингибитора ADAMTS-13, можно лечить ADAMTS-13 одновременно с лечением ингибирующей MASP-2 композицией по настоящему изобретению.

В следующем аспекте настоящего изобретения субъекта, страдающего от TTP, сначала можно лечить ингибирующей MASP-2 композицией по настоящему изобретению, которую вводят через установленный катетер, например, установленный внутривенный катетер или установленный подкожный катетер, в течение первого периода времени, такого как один час, двенадцать часов, один день, два дня или три дня. Затем субъекта можно лечить в течение второго периода времени ингибирующей MASP-2 композицией, вводимой обычными подкожными инъекциями, например, ежедневно, два раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или раз в два месяца.

В следующем аспекте настоящего изобретения ингибирующую MASP-2 композицию по настоящему изобретению можно вводить субъекту, страдающему от TTP, без плазмафереза (то есть, субъекту, чьи симптомы TTP не лечили плазмаферезом и не лечат плазмаферезом в период лечения ингибирующей MASP-2 композицией), во избежание потенциальных осложнений плазмафереза, включающих кровотечение, инфицирование и воздействие болезнетворных и/или аллергических факторов, присутствующих в плазме донора, или в случае субъекта, отвергающего плазмаферез, или в условиях, когда плазмаферез недоступен.

В следующем аспекте настоящего изобретения ингибирующую MASP-2 композицию по настоящему изобретению можно вводить субъекту, страдающему от TTP, в сочетании с лечением пациента плазмаферезом. Например, субъекту, получающему лечение плазмаферезом, затем можно вводить ингибирующую MASP-2 композицию, после проведения, или поочередно с проведением, плазмафереза.

В следующем аспекте настоящего изобретения субъекта, страдающего от рефрактерной TTP, то есть, субъекта, чьи симптомы TTP не изменялись адекватно в ответ

на другое лечение, такое как плазмаферез, можно лечить ингибирующей MASP-2 композицией по настоящему изобретению с использованием, или без использования, дополнительного плазмафереза.

В следующем аспекте настоящего изобретения можно проводить мониторинг субъекта, страдающего от, или имеющего риск развития, TTP и получающего лечение ингибирующей MASP-2 композицией по настоящему изобретению, определяя периодически, например, каждые двенадцать часов или ежедневно, уровень по меньшей мере одного фактора комплемента, при этом определение сниженного уровня по меньшей мере одного фактора комплемента в сравнении со стандартным значением, или значением у здорового контрольного субъекта, указывает на необходимость продолжения лечения композицией.

Как в профилактическом, так и в терапевтическом, режимах композиции, содержащие ингибирующие MASP-2 средства, можно вводить в нескольких дозах до достижения достаточного терапевтического результата у субъекта. В одном варианте осуществления изобретения ингибирующее MASP-2 средство представляет собой анти-MASP-2 антитело, которое предпочтительно можно вводить взрослому пациенту (например, взрослому пациенту со средней массой тела 70 кг) в дозе от 0,1 мг до 10000 мг, более предпочтительно от 1,0 мг до 5000 мг, более предпочтительно от 10,0 мг до 2000 мг, более предпочтительно от 10,0 мг до 1000 мг и еще более предпочтительно от 50,0 мг до 500 мг. Для малолетних пациентов дозу можно корректировать пропорционально массе тела пациента. Применение ингибирующих MASP-2 композиций по настоящему изобретению можно выполнять путем однократного введения композиции или путем ограниченного количества последовательных введений для лечения TTP. Альтернативно, композицию можно вводить с периодическими интервалами, например, ежедневно, два раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или раз в два месяца, в течение длительного периода времени для лечения TTP.

В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий от TTP, получал ранее, или получает в настоящее время, лечение ингибитором терминального компонента комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции по изобретению, содержащей ингибитор MASP-2, и дополнительное введение субъекту ингибитора терминального компонента комплемента, который ингибирует расщепление белка C5 комплемента. В некоторых вариантах осуществления ингибитор терминального компонента комплемента представляет собой гуманизированное анти-C5 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ингибитор терминального компонента комплемента представляет собой экулизумаб.

VI. Примеры

Следующие примеры лишь иллюстрируют наилучший способ осуществления на практике изобретения, но не предназначены для ограничения изобретения. Все литературные источники, цитируемые в настоящем документе, специально включены в

настоящий документ посредством ссылки.

Пример 1

В данном примере описано получение линии мышей с дефицитом MASP-2 (MASP-2-/-), но с достаточным количеством MAp19 (MAp19+/+).

Материалы и методы

Был сконструирован направленный вектор pKO-NTKV 1901 для разрушения трех экзонов, кодирующих С-концевую часть мышиного MASP-2, включая экзон, кодирующий домен сериновой протеазы, как показано на ФИГУРЕ 3. PKO-NTKV 1901 использовали для трансфицирования мышиной ES линии клеток E14.1a (SV129 Ola). Были отобраны устойчивые к неомицину и чувствительные к тимидинкиназе клоны. Был проведен скрининг 600 ES клонов, из них были выбраны четыре разных клона, которые, как было подтверждено методом саузерн-блоттинга, содержали ожидаемое избирательно направленное событие рекомбинации, как показано на ФИГУРЕ 3. Из этих четырех положительных клонов были получены химеры путем переноса эмбрионов. Затем было проведено возвратное скрещивание химер на генетическом фоне C57/BL6 для получения трансгенных самцов. Трансгенных самцов скрещивали с самками, получая потомство F1, в котором 50% потомков демонстрировали гетерозиготность в отношении разрушенного гена MASP-2. Гетерозиготных мышей скрещивали между собой, получая гомозиготное потомство с дефицитом MASP-2 в соотношении с гетерозиготными и дикого типа мышами, составляющем 1:2:1, соответственно.

Результаты и фенотип: Полученные гомозиготные мыши с дефицитом MASP-2-/-, как установлено, были жизнеспособными и фертильными, и имели дефицит MASP-2 по результатам саузерн-блоттинга, проводимого для подтверждения правильного события таргетирования, по результатам нозерн-блоттинга для подтверждения отсутствия мРНК MASP-2, и по результатам вестерн-блоттинга для подтверждения отсутствия белка MASP-2 (данные не представлены). Наличие мРНК MAp19 и отсутствие мРНК MASP-2 дополнительно подтверждали с использованием ОТ-ПЦР с временным разрешением на приборе LightCycler. Мыши MASP-2-/- продолжали экспрессировать мРНК и белок MAp19, MASP-1 и MASP-3, как и ожидалось (данные не представлены). Наличие и относительная представленность у мышей MASP-2-/- мРНК для пропердина, фактора B, фактора D, C4, C2, и C3 были оценены в анализе с использованием LightCycler и, как установлено, были идентичны таковым у контрольных однопометников дикого типа (данные не представлены). В плазме гомозиготных мышей MASP-2-/- полностью отсутствовала активация комплемента, опосредуемая лектиновым путем, как дополнительно описано в примере 2.

Получение линии MASP-2-/- на чистом фоне C57BL6: проводили возвратное скрещивание мышей MASP-2-/- с мышами чистой линии C57BL6 в течение девяти поколений до использования линии MASP-2-/- в качестве экспериментальной животной модели.

Также получали трансгенную линию мышей, которые являлись MASP-2-/-,

MAp19+/+ по мышиным белкам и экспрессировали трансген человеческого MASP-2 (нокаут мышиного MASP-2 и нокин человеческого MASP-2), следующим образом:

Материалы и методы

Был сконструирован миниген, кодирующий человеческий MASP-2, называемый «мини hMASP-2» (SEQ ID NO: 49), показанный на ФИГУРЕ 4, который включает область промотора человеческого гена MASP-2, включая первые 3 экзона (от экзона 1 до экзона 3), за которой следует последовательность кДНК, представляющая собой кодирующую последовательность следующих 8 экзонов, таким образом, был закодирован полноразмерный белок MASP-2 под контролем его эндогенного промотора. Миниконструкт hMASP-2 вводили инъекцией в оплодотворенные яйцеклетки мышей MASP-2-/- для замены отсутствующего мышиного гена MASP-2 экспрессируемым трансгеном человеческого MASP-2.

Пример 2

В данном примере показано, что MASP-2 необходим для активации комплемента через лектиновый путь.

Материалы и методы

Специфический для лектинового пути анализ расщепления C4: Анализ расщепления C4 описан в публикации Petersen, et al., J. Immunol. Methods 257:107 (2001), в этом анализе измеряют активацию лектинового пути на основании липотейхоевой кислоты (LTA) из S. aureus, которая связывает L-фиколин. Анализ, описанный Petersen с соавторами, (2001), был адаптирован для измерения активации лектинового пути через MBL, путем нанесения на планшет LPS и маннана или зимозана, с последующим добавлением сыворотки от мышей MASP-2-/-, как описано ниже. Анализ был также модифицирован для устранения возможности расщепления C4 вследствие классического пути. Это было достигнуто за счет использования буфера для разведения образцов, содержащего 1 M NaCl, что допускает высокоаффинное связывание компонентов узнавания лектинового пути с их лигандами, но предотвращает активацию эндогенного C4, тем самым исключается участие классического пути за счет диссоциации комплекса C1. Вкратце, в модифицированном анализе образцы сыворотки (разведенной буфером с высоким содержанием соли (1 M NaCl)) добавляют в покрытые лигандом планшеты, с последующим добавлением постоянного количества очищенного C4 в буфере с физиологической концентрацией соли. Связанные комплексы узнавания, содержащие MASP-2, расщепляют C4, что приводит к отложению C4b.

Аналитические Методы

1) Планшеты для микротитрования Nunc Maxisorb (Maxisorb, Nunc, каталожный № 442404, Fisher Scientific) покрывали маннаном в концентрации 1 мкг/мл (M7504 Sigma) или любым другим лигандом (например, таким как те, которые перечислены ниже), разбавленным в буфере для нанесения (15 мМ Na_2CO_3, 35 мМ $NaHCO_3$, pH 9,6).

В анализе использовали следующие реагенты:

a. маннан (1 мкг/лунку маннана (M7504 Sigma) в 100 мкл буфера для нанесения):

b. зимозан (1 мкг/лунку зимозана (Sigma) в 100 мкл буфера для нанесения);

c. LTA (1 мкг/лунку в 100 мкл буфера для нанесения или 2 мкг/лунку в 20 мкл метанола)

d. 1 мкг специфического для H-фиколина мАт 4H5 в буфере для нанесения

e. PSA из Aerococcus viridans (2 мкг/лунку в 100 мкл буфера для нанесения)

f. 100 мкл/лунку фиксированной в формалине S. aureus DSM20233 (OD_{550}=0,5) в буфере для нанесения.

2) Планшеты инкубировали в течение ночи при 4°C.

3) После инкубации в течение ночи оставшиеся сайты связывания белка насыщали путем инкубации планшетов с 0,1% HSA-TBS блокирующим буфером (0,1% (масс/об) HSA в 10 мМ Tris-Cl, 140 мМ NaCl, 1,5 мМ NaN_3, pH 7,4) в течение 1-3 часов, с последующим промыванием планшетов 3X TBS/Tween/Ca^{2+} (TBS с 0,05% Tween 20 и 5 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$, pH 7,4).

4) Тестируемые образцы сыворотки разбавляли в буфере связывания MBL (1 M NaCl), разбавленные образцы добавляли в планшеты и инкубировали в течение ночи при 4°C. Лунки, содержащие только буфер, использовали в качестве отрицательных контролей.

5) После инкубации в течение ночи при 4°C планшеты промывали 3X TBS/Tween/Ca^{2+}. В планшеты затем добавляли человеческий C4 (100 мкл/лунку, с концентрацией 1 мкг/мл, разведенный в BBS (4 мМ барбитал, 145 мМ NaCl, 2 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$, pH 7,4)) и инкубировали в течение 90 минут при 37°C. Планшеты вновь промывали 3X TBS/Tween/Ca^{2+}.

6) Отложение C4b обнаруживали при помощи конъюгированных со щелочной фосфатазой куриных антител против человеческого C4c (разведенных 1:1000 в TBS/Tween/Ca^{2+}), которые добавляли в планшеты и инкубировали в течение 90 минут при комнатной температуре. Затем планшеты вновь промывали 3X TBS/Tween/Ca^{2+}.

7) Щелочную фосфатазу обнаруживали путем добавления 100 мкл раствора субстрата *n*-нитрофенилфосфата, инкубации при комнатной температуре в течение 20 минут и снятия показаний при OD_{405} на планшетном ридере.

Результаты

На ФИГУРАХ 5A-B показано количество отложенного C4b на маннане (ФИГУРА 5A) и зимозане (ФИГУРА 5B) в разведенной сыворотке от мышей MASP-2+/+ (кресты), MASP-2+/- (заштрихованные кружки) и MASP-2-/- (заштрихованные треугольники). На ФИГУРЕ 5C показана относительная активность C4-конвертазы на планшетах, покрытых зимозаном (белые столбики) или маннаном (затененные столбики), у мышей MASP-2-/+ (n=5) и мышей MASP-2-/- (n=4), относительно мышей дикого типа (n=5), на основании измерения количества отложенного C4b, нормированного на сыворотку дикого типа. Планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению. Как показано на ФИГУРАХ 5A-C, в плазме от мышей MASP-2-/- полностью отсутствует активация комплемента, опосредованная лектиновым путем, на покрытых маннаном и зимозаном

планшетах. Эти результаты четко свидетельствуют о том, что MASP-2 является эффекторным компонентом лектинового пути.

Рекомбинантный MASP-2 восстанавливает зависимую от лектинового пути активацию C4 в сыворотке мышей MASP-2-/-

Для подтверждения того, что отсутствие MASP-2 являлось непосредственной причиной утраты зависимой от лектинового пути активации C4 у мышей MASP-2-/-, изучали эффект добавления рекомбинантного белка MASP-2 к образцам сыворотки в анализе расщепления C4, описанном выше. Рекомбинантные белки: функционально активный мышиный MASP-2 и каталитически неактивный мышиный MASP-2A (в котором остаток серина в активном центре домена сериновой протеазы был заменен остатком аланина) были получены и очищены, как описано ниже в примере 3. Объединенную сыворотку от 4 мышей MASP-2-/- преинкубировали с рекомбинантным мышиным MASP-2 или неактивным рекомбинантным мышиным MASP-2A в возрастающих концентрациях белка, и активность C4-конвертазы анализировали, как описано выше.

Результаты

Как показано на ФИГУРЕ 6, добавление функционально активного мышиного рекомбинантного белка MASP-2 (незаштрихованные треугольники) к сыворотке, полученной от мышей MASP-2-/-, приводило к восстановлению зависимой от лектинового пути активации C4 зависимым от концентрации белка образом, в то время как каталитически неактивный мышиный белок MASP-2A (звездочки) не восстанавливал активацию C4. Результаты, представленные на ФИГУРЕ 6, нормированы на активацию C4, наблюдаемую в объединенной сыворотке мышей дикого типа (пунктирная линия).

Пример 3

В данном примере описана рекомбинантная экспрессия и продуцирование белка для рекомбинантных полноразмерных человеческого, крысиного и мышиного MASP-2, полученных из MASP-2 полипептидов и каталитически инактивированных мутантных форм MASP-2.

Экспрессия полноразмерного человеческого, мышиного и крысиного MASP-2

Полноразмерную последовательность кДНК человеческого MASP-2 (SEQ ID NO: 4) также субклонировали в экспрессионный вектор pCI-Neo (Promega) млекопитающих, который управляет экспрессией под контролем области энхансера/промотора CMV в эукариотических клетках (описано в Kaufman R.J. et al., Nucleic Acids Research 19:4485-90, 1991; Kaufman, Methods in Enzymology, 185:537-66 (1991)). Каждую из полноразмерной мышиной кДНК (SEQ ID NO: 50) и крысиной кДНК (SEQ ID NO: 53) MASP-2 субклонировали в экспрессионный вектор pED. Экспрессионные векторы для MASP-2 затем трансфицировали в адгерентную линию DXB1 клеток яичника китайского хомяка с использованием стандартной процедуры трансфекции с фосфатом кальция, описанной в Maniatis et al., 1989. Клетки, трансфицированные этими конструктами, росли очень медленно, это указывало на то, что закодированная протеаза является цитотоксической.

Используя другой подход, конструкт минигена (SEQ ID NO: 49), содержащий кДНК человеческого MASP-2 под контролем его эндогенного промотора, временно трансфицировали в клетки яичника китайского хомяка (CHO). Человеческий белок MASP-2 секретировался в культуральную среду и был выделен, как описано ниже.

Экспрессия полноразмерного каталитически неактивного MASP-2

Обоснование

MASP-2 активируется путем аутокаталитического расщепления после того, как подкомпоненты узнавания MBL или фиколины (L-фиколин, H-фиколин или M-фиколин) связываются с их соответствующим углеводным паттерном. Аутокаталитическое расщепление, приводящее к активации MASP-2, часто происходит в процессе выделения MASP-2 из сыворотки, или в процессе очистки после рекомбинантной экспрессии. С целью получения более стабильного препарата белка для использования в качестве антигена, создавали каталитически неактивную форму MASP-2, названную MASP-2A, путем замены остатка серина, присутствующего в каталитической триаде домена протеазы остатком аланина в крысином (SEQ ID NO: 55 Ser617 на Ala617); в мышином (SEQ ID NO: 52 Ser617 на Ala617); или в человеческом (SEQ ID NO: 3 Ser618 на Ala618) белке.

Для получения каталитически неактивных человеческого и мышиного белков MASP-2A проводили сайт-направленный мутагенез с использованием олигонуклеотидов, приведенных в ТАБЛИЦЕ 5.

Олигонуклеотиды в ТАБЛИЦЕ 5 были разработаны для отжига области человеческой и мышиной кДНК, кодирующей ферментативно активный серин, и олигонуклеотида, содержащего несовпадение, с целью изменения кодона серина на кодон аланина. Например, олигонуклеотиды для ПЦР SEQ ID NO: 56-59 использовали в сочетании с человеческой кДНК MASP-2 (SEQ ID NO: 4) для амплификации области от инициирующего кодона до ферментативно активного серина и от серина до стоп-кодона, для создания полностью открытой рамки считывания с мутантного MASP-2A, содержащего мутацию Ser618 на Ala618. Продукты ПЦР очищали после электрофореза в агарозном геле и обработки полосы, и создавали одиночные наложения аденозина с использованием стандартного метода наращивания цепи. MASP-2A с аденозиновым «хвостом» затем клонировали в вектор pGEM-T easy и вводили трансформацией в E. coli.

Каталитически неактивный крысиный белок MASP-2A получали путем обработки киназой и отжига SEQ ID NO: 64 и SEQ ID NO: 65, объединяя эти два олигонуклеотида в равных молярных количествах, нагревая при 100°C в течение 2 минут и медленно охлаждая до комнатной температуры. Полученный отожженный фрагмент имеет Pst1 и Xba1 совместимые концы и был вставлен вместо фрагмента Pst1-Xba1 кДНК крысиного MASP-2 дикого типа (SEQ ID NO: 53), с получением крысиного MASP-2A.

5 'GAGGTGACGCAGGAGGGGCATTAGTGTTT 3' (SEQ ID NO: 64)

5' CTAGAAACACTAATGCCCCTCCTGCGTCACCTCTGCA 3' (SEQ ID NO: 65)

Каждый из человеческого, мышиного и крысиного MASP-2A дополнительно

субклонировали в какой-либо из экспрессионных векторов pED или pCI-Neo млекопитающих и трансфицировали в клетки яичника китайского хомяка линии DXB1, как описано ниже.

Используя другой подход, каталитически неактивную форму MASP-2 создавали с использованием метода, описанного в публикации Chen et al., J. Biol. Chem., 276(28):25894-25902, 2001. Вкратце, плазмиду, содержащую кДНК полноразмерного человеческого MASP-2 (описанную Thiel et al., Nature 386:506, 1997), расщепляли Xho1 и EcoR1, и кДНК MASP-2 (описанную в настоящем документе в виде SEQ ID NO: 4) клонировали в соответствующие сайты рестрикции бакуловирусного переносящего вектора pFastBac1 (Life Technologies, NY). Затем Ser618 в активном центре сериновой протеазы MASP-2 заменяли на Ala618, заменяя двухцепочечными олигонуклеотидами, кодирующими пептидную область аминокислот 610-625 (SEQ ID NO: 13), естественную область аминокислот 610-625, получая полноразмерный полипептид MASP-2 с неактивным доменом протеазы.

Конструирование экспрессионных плазмид, содержащих полипептидные области из человеческого Masp-2

Были получены следующие конструкты с использованием сигнального пептида MASP-2 (остатки 1-15 в SEQ ID NO: 5) для секреции различных доменов MASP-2. Конструкт для экспрессии домена CUBI человеческого MASP-2 (SEQ ID NO: 8) получали путем ПЦР-амплификации области, кодирующей остатки 1-121 в MASP-2 (SEQ ID NO: 6) (соответствующей N-концевому домену CUB1). Конструкт, экспрессирующий домен CUBIEGF человеческого MASP-2 (SEQ ID NO: 9), получали путем ПЦР-амплификации области, кодирующей остатки 1-166 в MASP-2 (SEQ ID NO: 6) (соответствующей N-концевому домену CUB1EGF). Конструкт, экспрессирующий домен CUBIEGFCUBII человеческого MASP-2 (SEQ ID NO: 10), получали путем ПЦР-амплификации области, кодирующей остатки 1-293 в MASP-2 (SEQ ID NO: 6) (соответствующей N-концевому домену CUBIEGFCUBII). Вышеуказанные домены амплифицировали методом ПЦР, используя полимеразу $Vent_R$ и pBS-MASP-2 в качестве матрицы, в соответствии с известными методами ПЦР. Последовательность 5'-смыслового праймера (5'-CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' SEQ ID NO: 34) вносит сайт рестрикции BamHI (подчеркнут) на 5'-конце продуктов ПЦР. Антисмысловые праймеры для каждого из доменов MASP-2, приведенных ниже в ТАБЛИЦЕ 5, разработаны для внесения стоп-кодона (выделено жирным шрифтом) после сайта EcoRI (подчеркнут) на конце каждого продукта ПЦР. После амплификации фрагменты ДНК расщепляли BamHI и EcoRI и клонировали в соответствующие сайты вектора pFastBac1. Полученные конструкты характеризовали путем рестрикционного картирования и подтверждали секвенированием дцДНК.

ТАБЛИЦА 5: ПРАЙМЕРЫ ДЛЯ ПЦР MASP-2

Домен MASP-2	5'-праймер для ПЦР	3'-праймер для ПЦР

SEQ ID NO: 8 CUBI (ак 1-121 в SEQ ID NO: 6)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTG ACCCTC 3' (SEQ ID NO: 34)	5'GGAKTTCCTAGGCTGC ATA (SEQ ID NO: 35)
SEQ ID NO: 9 CUBIEGF (ак 1-166 в SEQ ID NO: 6)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTG ACCCTC 3' (SEQ ID NO: 34)	5'GGAKTTCCTACAGGG CGCT 3' (SEQ ID NO: 36)
SEQ ID NO: 10 CUBIEGFCUBII (ак 1-293 в SEQ ID NO: 6)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTG ACCCTC 3' (SEQ ID NO: 34)	5'GGAKTTCCTAGTAGTG GAT 3' (SEQ ID NO: 37)
SEQ ID NO: 4 человеческий MASP-2	5'ATGAGGCTGCTGACCCTCCTG GGCCTTC 3' (SEQ ID NO: 56) hMASP-2_прямой	5'TTAKAKTCACTAKTTA TGTTCTCGATC 3' (SEQ ID NO: 59) hMASP-2_обратный
SEQ ID NO: 4 кДНК человеческого MASP-2	5'CAGAGGTGACGCAGGAGGGG CAC 3' (SEQ ID NO: 58) hMASP-2_ala_прямой	5'GTGCCCCTCCTGCGTC ACCTCTG 3' (SEQ ID NO: 57) hMASP-2_ala_обратный
SEQ ID NO: 50 кДНК мышиного MASP-2	5'ATGAGGCTACTCATCTTCCTG G3' (SEQ ID NO: 60) mMASP-2_прямой	5'TTAGAKATTACTTATT ATGTTCTCAKTCC3' (SEQ ID NO: 63) mMASP-2_обратный
SEQ ID NO: 50 кДНК мышиного MASP-2	5'CCCCCCCTGCGTCACCTCTGC AG3' (SEQ ID NO: 62) mMASP-2_ala_прямой	5'CTGCAGAGGTGACGC AGGGGGGG 3' (SEQ ID NO: 61) mMASP-2_ala_обратный

Рекомбинантная экспрессия MASP-2 в эукариотических клетках, и продуцирование ферментативно неактивных белков мышиного, крысиного и человеческого MASP-2A

Экспрессионные конструкты MASP-2 и MASP-2A, описанные выше, трансфицировали в клетки DXB1 стандартным методом трансфекции с фосфатом кальция (Maniatis et al., 1989). MASP-2A получали в бессывороточной среде для гарантии того, что препараты не будут загрязнены другими сывороточными белками. Среду собирали с конфлюэнтных клеток через день (всего четыре раза). Уровень рекомбинантного MASP-2A составлял в среднем примерно 1,5 мг/литр культуральной среды для каждого из трех видов белков.

Очистка белка MASP-2A

MASP-2A (Ser-Ala мутант, описанный выше) очищали аффинной хроматографией на колонках с MBP-A-агарозой. Эта стратегия позволяла производить быструю очистку без использования дополнительных меток. MASP-2A (100-200 мл среды, разбавленной равным объемом буфера для нанесения (50 мМ Tris-Cl, pH 7,5, содержащий 150 мМ NaCl и 25 мМ $CaCl_2$)) наносили на аффинную колонку с MBP-агарозой (4 мл), предварительно уравновешенную 10 мл буфера для нанесения. После промывания еще 10 мл буфера для нанесения белок элюировали в 1-мл фракциях 50 мМ Tris-Cl, pH 7,5, содержащим 1,25 М NaCl и 10 мМ ЭДТА. Фракции, содержащие MASP-2A, идентифицировали методом электрофореза в SDS-полиакриламидном геле. При необходимости MASP-2A дополнительно очищали методом ионообменной хроматографии на колонке MonoQ (HR 5/5). Белок диализовали в буфере 50 мМ Tris-Cl, pH 7,5, содержащем 50 мМ NaCl, и наносили на колонку, уравновешенную тем же буфером. После промывания связанный MASP-2A элюировали 0,05-1 М градиентом NaCl в объеме 10 мл.

Результаты

Выход 0,25-0,5 мг белка MASP-2A получали из 200 мл среды. Молекулярная масса 77,5 кДа, определенная методом MALDI-MC, превышала рассчитанное значение для немодифицированного полипептида (73,5 кДа) вследствие гликозилирования. Присоединение гликанов на каждом из сайтов N-гликозилирования являлось причиной наблюдаемой массы. MASP-2A мигрирует в виде одной полосы в SDS-полиакриламидных гелях, это свидетельствует о том, что он не был протеолитически расщеплен в процессе биосинтеза. Средневзвешенная молекулярная масса, определенная методом равновесного ультрацентрифугирования, соответствовала расчетному значению для гомодимеров гликозилированного полипептида.

Получение рекомбинантных полипептидов человеческого Masp-2

Другой способ получения рекомбинантных полипептидов MASP-2 и MASP-2A описан в Thielens, N.M., et al., J. Immunol. 166:5068-5077, 2001. Вкратце, клетки насекомых Spodoptera frugiperda (клетки Ready-Plaque Sf9, полученные от компании Novagen, Madison, WI) выращивают и поддерживают в бессывороточной среде Sf900II (Life Technologies) с добавлением 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина (Life Technologies). Клетки насекомых Trichoplusia ni (High Five) (предоставленные Jadwiga Chroboczek, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France) поддерживают в среде TC100 (Life Technologies), содержащей 10% ЭБС (Dominique Dutscher, Brumath, France), с добавлением 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина. Рекомбинантные бакуловирусы получают с использованием системы Bac-to-Bac (Life Technologies). Бакмидную ДНК очищают с использованием системы очистки Qiagen midiprep (Qiagen) и используют для трансфицирования клеток насекомых Sf9 при помощи целфектина в среде Sf900 II SFM (Life Technologies) в соответствии с протоколом производителя. Рекомбинантные вирусные частицы собирают через 4 дня, титруют в анализе вирусного бляшкообразования и амплифицируют, как описано King и Possee, в: The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, Chapman and Hall Ltd., London, pp. 111-114, 1992.

Клетки High Five ($1{,}75\times10^7$ клеток/175-см^2 флакон для культивирования тканей) инфицируют рекомбинантными вирусами, содержащими последовательности полипептидов MASP-2, при показателе множественности инфекции 2 в среде Sf900 II SFM при 28°C в течение 96 ч. Супернатанты собирают центрифугированием, и добавляют диизопропилфосфорофлюоридат до конечной концентрации 1 мМ.

Полипептиды MASP-2 секретируются в культуральную среду. Культуральные супернатанты диализуют против 50 мМ NaCl, 1 мМ $CaCl_2$, 50 мМ триэтаноламина гидрохлорид, pH 8,1, и наносят со скоростью 1,5 мл/мин на колонку Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) (2,8×12 см), уравновешенную в том же буфере. Элюцию проводят с использованием 1,2 литра линейного градиента до 350 мМ NaCl в том же буфере. Фракции, содержащие рекомбинантные полипептиды MASP-2, идентифицируют методом вестерн-блоттинга, осаждают добавлением $(NH_4)_2SO_4$ до 60% (масс/об) и оставляют на ночь при 4°C. Осадки ресуспендируют в буфере, содержащем 145 мМ NaCl, 1 мМ $CaCl_2$, 50 мМ триэтаноламина гидрохлорид, pH 7,4, и наносят на колонку TSK G3000 SWG (7,5×600 мм) (Tosohaas, Montgomeryville, PA), уравновешенную тем же буфером. Очищенные полипептиды затем концентрируют до 0,3 мг/мл методом ультрафильтрации в микроконцентрирующих устройствах Microsep (порог отсечения по ММ=10000) (Filtron, Karlstein, Germany).

Пример 4

В данном примере описан способ получения поликлональных антител против полипептидов MASP-2.

Материалы и методы

Антигены MASP-2

Поликлональную иммунную сыворотку против человеческого MASP-2 получают путем иммунизации кроликов следующими выделенными полипептидами MASP-2: человеческим MASP-2 (SEQ ID NO: 6), выделенным из сыворотки; рекомбинантным человеческим MASP-2 (SEQ ID NO: 6), MASP-2A, содержащим неактивный домен протеазы (SEQ ID NO: 13), как описано в примере 3; и рекомбинантными CUBI (SEQ ID NO: 8), CUBEGFI (SEQ ID NO: 9) и CUBEGFCUBII (SEQ ID NO: 10), экспрессированными, как описано выше в примере 3.

Поликлональные антитела: Кроликов в возрасте шести недель, примированных вакциной БЦЖ (бацилла Кальметта-Герена), иммунизируют путем инъекции 100 мкг полипептида MASP-2 с концентрацией 100 мкг/мл в стерильном солевом растворе. Инъекции выполняют каждые 4 недели, и титр антител определяют методом ELISA, как описано в примере 5. Культуральные супернатанты собирают для очистки антител аффинной хроматографией на белке А.

Пример 5

В данном примере описан способ получения мышиных моноклональных антител против полипептидов крысиного или человеческого MASP-2.

Материалы и методы

Самцам мышей A/J (Harlan, Houston, Tex.) в возрасте 8-12 недель вводят подкожной инъекцией 100 мкг полипептидов человеческого, или крысиного, rMASP-2 или rMASP-2A (полученных, как описано в примере 3) в полном адъюванте Фрейнда (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) в 200 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS), pH 7,4. С двухнедельными интервалами мышам дважды вводят подкожной инъекцией 50 мкг полипептидов человеческого, или крысиного, rMASP-2 или rMASP-2A в неполном адъюванте Фрейнда. В четвертую неделю мышам вводят инъекцией 50 мкг полипептидов человеческого, или крысиного, rMASP-2 или rMASP-2A в PBS, и через 4 дня проводят слияние клеток.

Для каждого слияния готовят одноклеточные суспензии из селезенки иммунизированной мыши и используют их для слияния с клетками миеломы Sp2/0. Проводят слияние 5×10^8 клеток Sp2/0 и 5×10^8 клеток селезенки в среде, содержащей 50% полиэтиленгликоль (M.W. 1450) (Kodak, Rochester, N.Y.) и 5% диметилсульфоксид (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Затем клетки доводят до концентрации $1,5\times10^5$ клеток селезенки на 200 мкл суспензии в среде Iscove (Gibco, Grand Island, N.Y.) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 0,1 мМ гипоксантина, 0,4 мкМ аминоптерина и 16 мкМ тимидина. Двести микролитров клеточной суспензии добавляют в каждую лунку примерно двадцати 96-луночных планшетов для культивирования. Через примерно десять дней культуральные супернатанты собирают для скрининга на способность к реагированию с очищенным фактором MASP-2 в анализе ELISA.

Анализ ELISA

Лунки планшетов для титрования Immulon 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, Va.) покрывают путем добавления 50 мкл очищенного hMASP-2 или крысиного rMASP-2 (или rMASP-2A) в концентрации 50 нг/мл на ночь при комнатной температуре. Низкая концентрация покрывающего MASP-2 позволяет отбирать высокоаффинные антитела. После удаления покрывающего раствора встряхиванием планшетов добавляют 200 мкл BLOTTO (нежирное сухое молоко) в PBS в каждую лунку на один час для блокирования неспецифических сайтов. Через час лунки промывают буфером PBST (PBS, содержащий 0,05% Tween 20). Пятьдесят микролитров культуральных супернатантов из каждой лунки со слитыми клетками собирают и смешивают с 50 мкл BLOTTO, а затем добавляют в отдельные лунки планшетов для титрования. После часа инкубации лунки промывают PBST. Связавшиеся мышиные антитела обнаруживают на основании реакции с антителами козы против IgG мыши (Fc-специфическими), конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.), разведенными 1:2000 в BLOTTO. Раствор субстрата пероксидазы, содержащий 0,1% 3.3.5.5-тетраметилбензидина (Sigma, St. Louis, Mo.), и 0,0003% пероксид водорода (Sigma) добавляют в лунки для развития окраски на 30 минут. Реакцию останавливают добавлением 50 мкл 2 М H_2SO_4 в каждую лунку. Оптическую плотность при 450 нм реакционной смеси определяют с использованием ридера для ELISA BioTek (BioTek

Instruments, Winooski, Vt.).

Анализ связывания MASP-2

Культуральные супернатанты, положительные по результатам анализа ELISA на MASP-2, описанного выше, можно тестировать в анализе связывания для определения аффинности связывания ингибирующих MASP-2 средств в отношении MASP-2. Аналогичный анализ также можно использовать для определения того, связываются ли ингибирующие средства с другими антигенами в системе комплемента.

Лунки полистирольных планшетов для титрования (96-луночные планшеты, среднее связывание, Corning Costar, Cambridge, MA) покрывают MASP-2 (20 нг/100 мкл/лунку, Advanced Research Technology, San Diego, CA) в фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7,4, в течение ночи при 4°C. После удаления аспирацией раствора MASP-2 лунки блокируют PBS, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA; Sigma Chemical), в течение 2 ч при комнатной температуре. Лунки без нанесенного MASP-2 служат в качестве контроля фона. Аликвоты супернатантов гибридом, или очищенных анти-MASP-2 моАт с разными концентрациями в блокирующем растворе добавляют в лунки. После инкубации в течение 2 ч при комнатной температуре лунки интенсивно промывают PBS. Связанные с MASP-2 анти-MASP-2 моАт обнаруживают путем добавления конъюгированных с пероксидазой антител козы против IgG мыши (Sigma Chemical) в блокирующем растворе, которые оставляют для инкубации на 1 ч при комнатной температуре. Планшеты вновь интенсивно промывают PBS и добавляют 100 мкл субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Реакцию TMB гасят добавлением 100 мкл 1 М фосфорной кислоты, и показания с планшетов снимают при 450 нм на планшетном ридере (SPECTRA MAX 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Культуральные супернатанты из лунок с положительными результатами затем тестируют на способность к ингибированию активации комплемента в функциональном анализе, таком как анализ расщепления C4, описанный в примере 2. Клетки в лунках с положительными результатами затем клонируют методом лимитирующих разведений. моАт вновь тестируют на способность к реагированию с hMASP-2 в анализе ELISA, описанном выше. Выбранные гибридомы выращивают во вращающихся колбах, и отработанный культуральный супернатант собирают для очистки антитела аффинной хроматографией на белке A.

Пример 6

В данном примере описано создание и продуцирование гуманизированных мышиных анти-MASP-2 антител и фрагментов антител.

Мышиное анти-MASP-2 моноклональное антитело получают, иммунизируя самцов мышей A/J, как описано в примере 5. Затем проводят гуманизацию мышиного антитела, как описано ниже, для уменьшения его иммуногенности за счет замены константных областей мышиного антитела их человеческими аналогами, получая химерное IgG и Fab-фрагмент антитела, который может быть использован для ингибирования

неблагоприятных эффектов MASP-2-зависимой активации комплемента у субъектов-людей в соответствии с настоящим изобретением.

1. Клонирование генов вариабельной области анти-MASP-2 из мышиных клеток гибридом.

Суммарную РНК выделяют из клеток гибридом, секретирующих анти-MASP-2 моАт (полученных, как описано в примере 7), с использованием RNAzol в соответствии с протоколом производителя (Biotech, Houston, Tex.). Первую цепь кДНК синтезируют с суммарной РНК с использованием олиго(дТ) в качестве праймеров. ПЦР проводят с использованием 3'-праймеров, полученных из константной С-области иммуноглобулина, и наборов вырожденных праймеров, полученных из генов лидерного пептида или первой каркасной области мышиных VH или VK, в качестве 5'-праймеров. Заякоренную ПЦР проводят, как описано в публикации Chen and Platsucas (Chen, P.F., Scand. J. Immunol. 35:539-549, 1992). Для клонирования гена VK получают двухцепочечную кДНК с использованием праймера Notl-MAK1 (5'-TGCGGCCGCTGTAGGTGCTGTCTTT-3' SEQ ID NO: 38). Отожженные адапторы AD1 (5'-GGAATTCACTCGTTATTCTCGGA-3' SEQ ID NO: 39) и AD2 (5'-TCCGAGAATAACGAGTG-3' SEQ ID NO: 40) лигируют на обоих 5' и 3' концах двухцепочечной кДНК. Адапторы на 3'-концах удаляют расщеплением Notl. Продукт расщепления затем используют в качестве матрицы в ПЦР с олигонуклеотидом AD1 в качестве 5'-праймера и MAK2 (5'-CATTGAAAGCTTTGGGGTAGAAGTTGTTC-3' SEQ ID NO: 41) в качестве 3'-праймера. Фрагменты ДНК размером примерно 500 п.н. клонируют в pUC19. Отбирают несколько клонов для анализа последовательности с целью подтверждения, что клонированная последовательность включает ожидаемую константную область мышиного иммуноглобулина. Олигонуклеотиды Not1-MAK1 и MAK2 получены из области VK и расположены на 182 и 84 п.н., соответственно, ниже от первой пары нуклеотидов гена С каппа. Выбирают клоны, содержащие полную VK и лидерный пептид.

Для клонирования гена VH получают двухцепочечную кДНК с использованием праймера Not1 MAG1 (5'-CGCGGCCGCAGCTGCTCAGAGTGTAGA-3' SEQ ID NO: 42). Отожженные адапторы AD1 и AD2 лигируют на обоих 5' и 3' концах двухцепочечной кДНК. Адапторы на 3'-концах удаляют расщеплением Notl. Продукт расщепления затем используют в качестве матрицы в ПЦР с олигонуклеотидом AD1 и MAG2 (5'-CGGTAAGCTTCACTGGCTCAGGGAAATA-3' SEQ ID NO: 43) в качестве праймеров. Фрагменты ДНК длиной 500-600 п.н. клонируют в pUC19. Олигонуклеотиды Notl-MAG1 и MAG2 получены из области мышиного гена Cγ.7.1 и расположены на 180 и 93 п.н., соответственно, ниже от первой п.н. мышиного гена Cγ.7.1. Выбирают клоны, содержащие полную VH и лидерный пептид.

2. Конструирование экспрессионных векторов для химерных анти-MASP-2 IgG и Fab.

Клонированные гены VH и VK, описанные выше, используют в качестве матриц в реакции ПЦР для добавления консенсусной последовательности Козак к 5'-концу, и сайта

донора сплайсинга к 3'-концу, нуклеотидной последовательности. После анализа последовательностей для подтверждения отсутствия ошибок ПЦР гены VH и VK вставляют в экспрессионные векторные кассеты, содержащие человеческие C.γ1 и C. каппа, соответственно, получая pSV2neoVH-huCγ1 и pSV2neoV-huCγ. Очищенные в градиента CsCl плазмидные ДНК векторов тяжелой и легкой цепей используют для трансфицирования клеток COS методом электропорации. Через 48 часов культуральный супернатант тестируют методом ELISA для подтверждения присутствия примерно 200 нг/мл химерных IgG. Клетки собирают и получают суммарную РНК. Первую цепь кДНК синтезируют с суммарной РНК, используя олиго(дТ) в качестве праймера. Эту кДНК используют в качестве матрицы в ПЦР, с получением фрагментов ДНК Fd и каппа-цепи. Для гена Fd ПЦР проводят с использованием 5'-AAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGCTGTGGAACT-3' (SEQ ID NO: 44) в качестве 5'-праймера и полученного из CH1 3'-праймера (5'-CGGGATCCTCAAACTTTCTTGTCCACCTTGG-3' SEQ ID NO: 45). Подтверждают, что последовательность ДНК содержит полный домен VH и домен CH1 человеческого IgG1. После расщепления надлежащими ферментами фрагменты ДНК Fd вставляют в сайты рестрикции HindIII и BamHI экспрессионной векторной кассеты pSV2dhfr-TUS, получая pSV2dhfrFd. Плазмида pSV2 коммерчески доступна и состоит из сегментов ДНК из разных источников: ДНК pBR322 (тонкая линия) содержит точку начала репликации ДНК pBR322 (pBR ori) и ген лактамазы, придающий устойчивость к ампициллину (Amp); ДНК SV40, представленная более широкой штриховкой и отмеченная, содержит точку начала репликации ДНК SV40 (SV40 ori), ранний промотор (в 5'-направлении от генов dhfr и neo) и сигнал полиаденилирования (в 3'-направлении от генов dhfr и neo). Сигнал полиаденилирования (pA) из SV40 также помещен на 3'-конце гена Fd.

Для гена каппа-цепи ПЦР проводят с использованием 5'-AAGAAAGCTTGCCGCCACCATGTTCTCACTAGCTCT-3' (SEQ ID NO: 46) в качестве 5'-праймера и полученного из CK 3'-праймера (5'-CGGGATCCTTCTCCCTCTAACACTCT-3' SEQ ID NO: 47). Подтверждают, что последовательность ДНК содержит полные области VK и CK человеческого иммуноглобулина. После расщепления надлежащими ферментами фрагменты ДНК каппа-цепи вставляют в сайты рестрикции HindIII и BamHI экспрессионной векторной кассеты pSV2neo-TUS, получая pSV2neoK. Экспрессия обоих генов Fd и каппа-цепи находится под контролем элементов энхансера и промотора из HCMV. Поскольку ген Fd не содержит кодон для аминокислотного остатка цистеина, вовлеченного в межцепочечную дисульфидную связь, этот рекомбинантный химерный Fab содержит нековалентно связанные тяжелые и легкие цепи. Этот химерный Fab обозначен cFab.

Для получения рекомбинантного Fab с дисульфидной связью между тяжелой и легкой цепями вышеуказанный ген Fd может быть увеличен для включения кодирующей последовательности для дополнительных 9 аминокислот (EPKSCDKTH SEQ ID NO: 48) из шарнирной области человеческого IgG1. Сегмент ДНК BstEII-BamHI, кодирующий 30

аминокислот на 3'-конце гена Fd может быть заменен сегментами ДНК, кодирующими увеличенный Fd, с получением pSV2dhfrFd/9aa.

3. Экспрессия и очистка химерного анти-MASP-2 IgG

Для получения линий клеток, секретирующих химерное анти-MASP-2 IgG, клетки NSO трансфицируют очищенными плазмидными ДНК pSV2neoVH-huC.γ1 и pSV2neoV-huC.kappa методом электропорации. Трансфицированные клетки отбирают в присутствии 0,7 мг/мл G418. Клетки выращивают в 250-мл вращающихся колбах, используя бессывороточную среду.

Культуральный супернатант с 100 мл культуры из вращающейся колбы наносят на 10-мл колонку PROSEP-A (Bioprocessing, Inc., Princeton, N.J.). Колонку промывают 10 объемами слоя PBS. Связавшееся антитело элюируют 50 мМ цитратным буфером, pH 3,0. Равный объем 1 М Hepes, pH 8,0, добавляют во фракцию, содержащую очищенное антитело, для доведения pH до 7,0. Остаточные соли удаляют путем замены буфера на PBS методом ультрафильтрации на мембране Millipore (порог отсечения по ММ: 3000). Белковую концентрацию очищенного антитела определяют методом BCA (Pierce).

4. Экспрессия и очистка химерных анти-MASP-2 Fab

Для получения линий клеток, секретирующих химерные анти-MASP-2 Fab, клетки CHO трансфицируют очищенными плазмидными ДНК pSV2dhfrFd (или pSV2dhfrFd/9aa) и pSV2neokappa, методом электропорации. Трансфицированные клетки отбирают в присутствии G418 и метотрексата. Отобранные линии клеток размножают при возрастающих концентрациях метотрексата. Клетки субклонируют одиночными клетками, используя метод лимитирующего разведения. Затем продуцирующие на высоком уровне, клонированные одиночными клетками клеточные линии выращивают в 100-мл вращающихся колбах, используя бессывороточную среду.

Химерные анти-MASP-2 Fab очищают аффинной хроматографией с использованием мышиного антиидиотипического моАт к анти-MASP-2 моАт. Антиидиотипическое моАт к анти-MASP-2 моАт можно получать путем иммунизации мышей мышиным анти-MASP-2 моАт, конъюгированным с гемоцианином морского блюдечка (KLH), и проведения скрининга на специфически связывающее моАт, которое может конкурировать с человеческим MASP-2. Для очистки 100 мл супернатанта с культивируемых во вращающихся колбах клеток CHO, продуцирующих cFab или cFab/9aa, наносят на аффинную колонку со связанным антиидиотипическим моАт к анти-MASP-2 моАт. Затем колонку тщательно промывают PBS, после чего связавшиеся Fab элюируют 50 мМ диэтиламином, pH 11,5. Остаточные соли удаляют путем замены буфера, как описано выше. Белковую концентрацию очищенных Fab определяют методом BCA (Pierce).

Способность химерных анти-MASP-2 IgG, cFab и cFAb/9aa ингибировать MASP-2-зависимые пути комплемента можно определять в анализах ингибирования, описанных в примере 2 или примере 7.

Пример 7

В данном примере описан in vitro анализ расщепления C4, используемый для функционального скрининга с целью идентификации ингибирующих MASP-2 средств, способных блокировать MASP-2-зависимую активацию комплемента через L-фиколин/P35, H-фиколин, M-фиколин или маннан.

Анализ расщепления C4

Анализ расщепления C4 описан в публикации Petersen, S.V., et al., J. Immunol. Methods 257:107, 2001, в анализе измеряют активацию лектинового пути, возникающую в результате связывания липотейхоевой кислоты (LTA) из S. aureus с L-фиколином.

Реагенты

Фиксированную в формалине S. aureous (DSM20233) получают следующим образом: бактерии выращивают в течение ночи при 37°C в триптической соевой кровяной среде, промывают три раза PBS, затем фиксируют в течение 1 ч при комнатной температуре в смеси PBS/0,5% формалин, и промывают еще три раза PBS, с последующим ресуспендированием в буфере для нанесения (15 мМ Na_2CO_3, 35 мМ $NaHCO_3$, pH 9,6).

Анализ

Лунки планшета для микротитрования Nunc MaxiSorb (Nalgene Nunc International, Rochester, NY) покрывают: 100 мкл фиксированной в формалине S. aureus DSM20233 (OD_{550}=0,5) в буфере для нанесения с 1 мкг L-фиколина в буфере для нанесения. После инкубации в течение ночи лунки блокируют 0,1% раствором человеческого сывороточного альбумина (HSA) в TBS (10 мМ Tris-HCl, 140 мМ NaCl, pH 7,4), затем промывают TBS, содержащим 0,05% Tween 20 и 5 мМ $CaCl_2$ (промывочный буфер). Образцы человеческой сыворотки разбавляют буфером 20 мМ Tris-HCl, 1 М NaCl, 10 мМ $CaCl_2$, 0,05% Triton X-100, 0,1% HSA, pH 7,4, который предотвращает активацию эндогенного C4 и вызывает диссоциацию комплекса C1 (состоящего из C1q, C1r и C1s). Ингибирующие MASP-2 средства, включая анти-MASP-2 моАт и ингибирующие пептиды, добавляют к образцам сыворотки в различных концентрациях. Разбавленные образцы добавляют в планшет и инкубируют в течение ночи при 4°C. Через 24 часа планшеты тщательно промывают промывочным буфером, затем в каждую лунку добавляют 0,1 мкг очищенного человеческого C4 (полученного как описано в Dodds, A.W., Methods Enzymol. 223:46, 1993) в 100 мкл раствора 4 мМ барбитала, 145 мМ NaCl, 2 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$, pH 7,4. Через 1,5 ч при 37°C планшеты вновь промывают, отложение C4b обнаруживают с использованием конъюгированных со щелочной фосфатазой куриных антител против человеческого C4c (полученных от компании Immunsystem, Uppsala, Sweden) и измеряют с использованием колориметрического субстрата ρ-нитрофенилфосфата.

Анализ C4 на маннане

Анализ, описанный выше, адаптируют для измерения активации лектинового пути через MBL путем нанесения на планшет LSP и маннана, с последующим добавлением сыворотки, смешанной с различными ингибирующими MASP-2 средствами.

Анализ C4 на H-фиколине (Ag Hakata)

Анализ, описанный выше, адаптируют для измерения активации лектинового пути через H-фиколин путем нанесения на планшет LSP и H-фиколина, с последующим добавлением сыворотки, смешанной с различными ингибирующими MASP-2 средствами.

Пример 8

Следующий анализ демонстрирует наличие классического пути активации у мышей дикого типа и MASP-2-/-.

Методы

Иммунные комплексы получали in situ путем нанесения на планшеты для микротитрования (Maxisorb, Nunc, каталожный № 442404, Fisher Scientific) 0,1% человеческого сывороточного альбумина в 10 мМ Tris, 140 мМ NaCl, pH 7,4, на 1 час при комнатной температуре, с последующей инкубацией в течение ночи при 4°C с иммунной сывороткой овцы против цельной сыворотки (Scottish Antibody Production Unit, Carluke, Scotland), разведенной 1:1000 в TBS/Tween/Ca^{2+}. Образцы сыворотки получали от мышей дикого типа и MASP-2-/- и добавляли в покрытые лунки планшета. Готовили контрольные образцы, в которых C1q был истощен из образцов сыворотки дикого типа и MASP-2-/-. Истощенную по C1q мышиную сыворотку получали с использованием связанных с белком A гранул Dynabeads (Dynal Biotech, Oslo, Norway), покрытых кроличьими IgG против человеческого C1q (Dako, Glostrup, Denmark), в соответствии с инструкциями поставщика. Планшеты инкубировали в течение 90 минут при 37°C. Связанный C3b обнаруживали при помощи поликлональных антител против человеческого C3c (Dako A 062), разведенных 1:1000 в TBS/Tween/Ca^{++}. Вторичное антитело представляло собой антитело козы против IgG кролика.

Результаты

На ФИГУРЕ 7 показаны относительные уровни отложения C3b на планшетах, покрытых IgG, в сыворотке дикого типа, сыворотке MASP-2-/-, истощенной по C1q сыворотке дикого типа и истощенной по C1q сыворотке MASP-2-/-. Эти результаты демонстрируют, что классический путь является интактным у мышей линии MASP-2-/-.

Пример 9

Следующий анализ используют для тестирования того, блокирует ли ингибирующее MASP-2 средство классический путь, путем анализа эффекта ингибирующего MASP-2 средства в условиях, в которых происходит инициация классического пути иммунными комплексами.

Методы

Для тестирования эффекта ингибирующего MASP-2 средства на условия активации комплемента, в которых классический путь инициируется иммунными комплексами, 50-мкл образцы в трех повторах, содержащие 90% НЧС, инкубируют при 37°C в присутствии 10 мкг/мл иммунного комплекса (IC) или PBS, и также параллельно тестируют в трех повторах образцы (+/-IC), которые содержат 200 нМ моноклональное антитело против пропердина, в процессе инкубации при 37°C. Через два часа инкубации при 37°C ко всем образцам добавляют 13 мМ ЭДТА для остановки дальнейшей активации комплемента, и

образцы немедленно охлаждают до 5°C. Затем образцы хранят при -70°C до проведения анализа на продукты активации комплемента (C3a и sC5b-9) с использованием наборов для ELISA (Quidel, каталожные №№ A015 и A009) в соответствии с инструкциями производителя.

Пример 10

В данном примере описана идентификация высокоаффинных анти-MASP-2 Fab2-фрагментов антитела, которые блокируют активность MASP-2.

Предпосылки и обоснование

MASP-2 представляет собой сложный белок со множеством отдельных функциональных доменов, включая: сайт(ы) связывания для MBL и фиколинов, каталитический центр сериновой протеазы, сайт связывания для протеолитического субстрата C2, сайт связывания для протеолитического субстрата C4, сайт расщепления MASP-2 для аутоактивации зимогена MASP-2 и два сайта связывания Ca^{++}. Были идентифицированы Fab2-фрагменты антитела, которые связывают с высокой аффинностью MASP-2, и идентифицированные Fab2-фрагменты были протестированы в функциональном анализе для определения того, способны ли они блокировать функциональную активность MASP-2.

Для блокирования функциональной активности MASP-2 антитело или Fab2-фрагмент антитела должны связывать и блокировать структурный эпитоп на MASP-2, который необходим для функциональной активности MASP-2. Таким образом, многие, или все, из связывающихся с высокой аффинностью анти-MASP-2 Fab2-фрагментов могут не ингибировать функциональную активность MASP-2, если только они не связывают структурные эпитопы на MASP-2, которые непосредственно вовлечены в функциональную активность MASP-2.

Функциональный анализ, позволяющий измерять ингибирование образования C3-конвертазы лектинового пути, использовали для оценки «блокирующей активности» анти-MASP-2 Fab2. Известно, что основная физиологическая роль MASP-2 в лектиновом пути заключается в создании следующего функционального компонента опосредованного лектином пути комплемента, а именно, C3-конвертазы лектинового пути. C3-конвертаза лектинового пути является важным ферментативным комплексом (C4bC2a), который протеолитически расщепляет C3 на C3a и C3b. MASP-2 не является структурным компонентом C3-конвертазы лектинового пути (C4bC2a); однако функциональная активность MASP-2 необходима для создания двух белковых компонентов (C4b, C2a), которые составляют C3-конвертазу лектинового пути. Более того, все из отдельных функциональных активностей MASP-2, перечисленных выше, судя по всему, необходимы MASP-2 для создания C3-конвертазы лектинового пути. По этой причине предпочтительным анализом для оценки «блокирующей активности» анти-MASP-2 Fab2 считается функциональный анализ, в котором измеряют ингибирование образования C3-конвертазы лектинового пути.

Получение высокоаффинных Fab2

Библиотеку фагового дисплея последовательностей вариабельных областей легкой и тяжелой цепей человеческого антитела и автоматизированную технологию отбора антител для идентификации Fab2, реагирующих с выбранными интересующими лигандами, использовали для получения высокоаффинных Fab2 к крысиному белку MASP-2 (SEQ ID NO: 55). Известное количество крысиного белка MASP-2 (~1 мг, чистота >85%) использовали для скрининга антител. Использовали три раунда амплификации для отбора антител с наилучшей аффинностью. Примерно 250 разных «успешных находок», экспрессирующих фрагменты антитела, были отобраны для скрининга методом ELISA. «Успешные находки» с высокой аффинностью впоследствии были секвенированы для определения уникальности разных антител.

Пятьдесят уникальных анти-MASP-2 антител были очищены, и 250 мкг каждого очищенного Fab2 антитела использовали для определения характеристик аффинности связывания MASP-2 и функционального тестирования пути комплемента, как описано более подробно ниже.

Анализы, используемые для оценки ингибирующей (блокирующей) активности анти-MASP-2 Fab2

1. Анализ для определения ингибирования образования С3-конвертазы лектинового пути:

Предпосылки

С3-конвертаза лектинового пути представляет собой ферментативный комплекс (C4bC2a), который протеолитически расщепляет С3 на два сильных провоспалительных фрагмента, анафилатоксин С3а и опсонин С3b. Образование С3-конвертазы, судя по всему, является ключевым этапом в лектиновом пути для медиации воспаления. MASP-2 не является структурным компонентом С3-конвертазы лектинового пути (C4bC2a); таким образом, анти-MASP-2 антитела (или Fab2) не будут непосредственно ингибировать активность ранее существующей С3-конвертазы. Однако активность сериновой протеазы MASP-2 необходима для образования двух белковых компонентов (C4b, C2a), которые составляют С3-конвертазу лектинового пути. Вследствие этого, анти-MASP-2 Fab2, которое ингибирует функциональную активность MASP-2 (то есть, блокирующее анти-MASP-2 Fab2) будет ингибировать de novo образование С3-конвертазы лектинового пути. С3 содержит необычную и высоко реакционноспособную тиоэфирную группу в своей структуре. После расщепления С3 С3-конвертазой в этом анализе тиоэфирная группа на С3b может образовывать ковалентную связь с гидроксильными или аминогруппами на макромолекулах, иммобилизованных на дне пластиковых лунок за счет сложноэфирных или амидных связей, это облегчает обнаружение С3b в анализе ELISA.

Дрожжевой маннан является известным активатором лектинового пути. В следующем способе измерения образования С3-конвертазы пластиковые лунки, покрытые маннаном, инкубировали в течение 30 мин при 37°С с разбавленной крысиной сывороткой для активации лектинового пути. Затем лунки промывали и анализировали на С3b, иммобилизованный в лунках, стандартными методами ELISA. Количество С3b,

образовавшегося в данном анализе, напрямую отражает de novo образование С3-конвертазы лектинового пути. Анти-MASP-2 Fab2 в выбранных концентрациях тестировали в данном анализе на их способность ингибировать образование С3-конвертазы и последующее образование С3b.

Методы

96-луночные планшеты со средней степенью связывания Costar инкубировали в течение ночи при 5°С с маннаном, разведенным в 50 мМ карбонатном буфере, pH 9,5, нанесенным в количестве 1 мкг/50 мкл/лунку. После инкубации в течение ночи каждую лунку промывали три раза по 200 мкл PBS. Затем лунки блокировали по 100 мкл/лунку 1% раствором бычьего сывороточного альбумина в PBS и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с осторожным перемешиванием. Затем каждую лунку промывали три раза по 200 мкл PBS. Образцы анти-MASP-2 Fab2 разбавляли до выбранных концентраций содержащим Ca^{++} и Mg^{++} буфером GVB (4,0 мМ барбитал, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ $MgCl_2$, 2,0 мМ $CaCl_2$, 0,1% желатин, pH 7,4) при 5°С. К вышеуказанным образцам при 5°С добавляли 0,5% крысиную сыворотку, и 100 мкл переносили в каждую лунку. Планшеты накрывали и инкубировали в течение 30 минут в водяной бане при 37°С для активации комплемента. Реакцию останавливали перенесением планшетов из водяной бани с температурой 37°С в контейнер, содержащий смесь льда с водой. Каждую лунку промывали пять раз по 200 мкл PBS-Tween 20 (0,05% Tween 20 в PBS), затем промывали два раза по 200 мкл PBS. Добавляли по 100 мкл/лунку разведенное 1:10000 первичное антитело (антитело кролика против человеческого С3с, DAKO A0062) в PBS, содержащем 2,0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, и инкубировали 1 час при комнатной температуре с осторожным перемешиванием. Каждую лунку промывали 5×200 мкл PBS. Добавляли 100 мкл/лунку разведенного 1:10000 вторичного антитела (конъюгированное с пероксидазой антитело козы против IgG кролика, American Qualex A102PU) в PBS, содержащем 2,0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре на шейкере с осторожным перемешиванием. Каждую лунку промывали пять раз по 200 мкл PBS. Добавляли по 100 мкл/лунку субстрата пероксидазы TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Реакцию пероксидазы останавливали добавлением по 100 мкл/лунку 1,0 М H_3PO_4 и измеряли OD_{450}.

2. Анализ для измерения ингибирования MASP-2-зависимого расщепления С4

Предпосылки

Активность сериновой протеазы MASP-2 является высокоспецифичной, и были идентифицированы лишь два белковых субстрата для MASP-2; С2 и С4. Расщепление С4 приводит к образованию С4а и С4b. Анти-MASP-2 Fab2 может связывать структурные эпитопы на MASP-2, которые непосредственно участвуют в расщеплении С4 (например, сайт связывания MASP-2 для С4; каталитический центр сериновой протеазы MASP-2), и за счет этого ингибировать функциональную активность расщепления С4 у MASP-2.

Дрожжевой маннан является известным активатором лектинового пути. В

следующем способе измерения активности расщепления C4 MASP-2 пластиковые лунки, покрытые маннаном, инкубировали в течение 30 мин при 37°C с разбавленной крысиной сывороткой для активации лектинового пути. Поскольку первичное антитело, используемое в данном анализе ELISA, узнает лишь человеческий C4, в разбавленную крысиную сыворотку также добавляли человеческий C4 (1,0 мкг/мл). Затем лунки промывали и анализировали на человеческий C4b, иммобилизованный в лунках, стандартными методами ELISA. Количество C4b, образовавшееся в данном анализе, является мерой MASP-2-зависимой активности расщепления C4. Анти-MASP-2 Fab2 в выбранных концентрациях тестировали в данном анализе на его способность ингибировать расщепление C4.

Методы

96-луночные планшеты со средней степенью связывания Costar инкубировали в течение ночи при 5°C с маннаном, разведенным в 50 мМ карбонатном буфере, pH 9,5, нанесенным в количестве 1 мкг/50 мкл/лунку. Каждую лунку промывали 3X по 200 мкл PBS. Затем лунки блокировали по 100 мкл/лунку 1% раствором бычьего сывороточного альбумина в PBS и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с осторожным перемешиванием. Затем каждую лунку промывали 3X по 200 мкл PBS. Образцы анти-MASP-2 Fab2 разбавляли до выбранных концентраций содержащим Ca^{++} и Mg^{++} буфером GVB (4,0 мМ барбитал, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ $MgCl_2$, 2,0 мМ $CaCl_2$, 0,1% желатин, pH 7,4) при 5°C. В эти образцы также включали 1,0 мкг/мл человеческого C4 (Quidel). К вышеуказанным образцам при 5°C добавляли 0,5% крысиную сыворотку, и 100 мкл переносили в каждую лунку. Планшеты накрывали и инкубировали в течение 30 минут в водяной бане при 37°C для активации комплемента. Реакцию останавливали перенесением планшетов из водяной бани с температурой 37°C в контейнер, содержащий смесь льда с водой. Каждую лунку промывали 5X по 200 мкл PBS-Tween 20 (0,05% Tween 20 в PBS), затем промывали два раза по 200 мкл PBS. Добавляли по 100 мкл/лунку разведенное 1:700 конъюгированное с биотином куриное антитело против человеческого C4c (Immunsystem AB, Uppsala, Sweden) в PBS, содержащем 2,0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA), и инкубировали один час при комнатной температуре с осторожным перемешиванием. Каждую лунку промывали 5X по 200 мкл PBS. Добавляли по 100 мкл/лунку конъюгированного с пероксидазой стрептавидина в концентрации 0,1 мкг/мл (Pierce Chemical №21126) в PBS, содержащем 2,0 мг/мл BSA, и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре на шейкере с осторожным перемешиванием. Каждую лунку промывали 5X по 200 мкл PBS. Добавляли по 100 мкл/лунку субстрата пероксидазы TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) и инкубировали при комнатной температуре в течение 16 мин. Реакцию пероксидазы останавливали добавлением по 100 мкл/лунку 1,0 М H_3PO_4 и измеряли OD_{450}.

3. Анализ связывания Fab2 против крысиного MASP-2 с «естественным» крысиным MASP-2

Предпосылки

MASP-2, как правило, присутствует в плазме в виде димерного комплекса MASP-2, который также включает специфические молекулы лектина (манноза-связывающий белок (MBL) и фиколины). Таким образом, если стоит задача изучения связывания анти-MASP-2 Fab2 с физиологической формой MASP-2, важно разработать анализ связывания, в котором используется взаимодействие между Fab2 и «естественным» MASP-2 в плазме, а не очищенным рекомбинантным MASP-2. В данном анализе связывания «естественный» комплекс MASP-2-MBL из 10% крысиной сыворотки сначала иммобилизовали на покрытых маннаном лунках. Затем изучали аффинность связывания различных анти-MASP-2 Fab2 с иммобилизованным «естественным» MASP-2 стандартным методом ELISA.

Методы

96-луночные планшеты с высокой степень связывания Costar инкубировали в течение ночи при 5°C с маннаном, разведенным в 50 мМ карбонатном буфере, pH 9,5, нанесенным в количестве 1 мкг/50 мкл/лунку. Каждую лунку промывали 3X по 200 мкл PBS. Затем лунки блокировали по 100 мкл/лунку 0,5% раствором нежирного сухого молока в PBST (PBS с 0,05% Tween 20) и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с осторожным перемешиванием. Каждую лунку промывали 3X по 200 мкл промывочного буфера TBS/Tween/Ca^{++} (Tris-буферный солевой раствор, 0,05% Tween 20, содержащий 5,0 мМ $CaCl_2$, pH 7,4). Готовили на льду 10% крысиную сыворотку в буфере для связывания с высоким содержанием соли (20 мМ Tris, 1,0 М NaCl, 10 мМ $CaCl_2$, 0,05% Triton-X100, 0,1% (масс/об) бычьего сывороточного альбумина, pH 7,4). Добавляли по 100 мкл/лунку и инкубировали в течение ночи при 5°C. Затем лунки промывали 3X по 200 мкл промывочного буфера TBS/Tween/Ca^{++}. После этого лунки промывали 2X по 200 мкл PBS. Добавляли по 100 мкл/лунку анти-MASP-2 Fab2 в выбранных концентрациях, разведенные в содержащем Ca^{++} и Mg^{++} буфере GVB (4,0 мМ барбитал, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ $MgCl_2$, 2,0 мМ $CaCl_2$, 0,1% желатин, pH 7,4), и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с осторожным перемешиванием. Каждую лунку промывали 5X по 200 мкл PBS. Добавляли по 100 мкл/лунку HRP-конъюгированное антитело козы против Fab2 (Biogenesis, каталожный № 0500-0099), разведенное 1:5000 в 2,0 мг/мл растворе бычьего сывороточного альбумина в PBS, и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с осторожным перемешиванием. Каждую лунку промывали 5X по 200 мкл PBS. Добавляли по 100 мкл/лунку субстрат пероксидазы TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) и инкубировали при комнатной температуре в течение 70 мин. Реакцию пероксидазы останавливали добавлением по 100 мкл/лунку 1,0 М H_3PO_4 и измеряли OD_{450}.

Результаты

Примерно 250 разных Fab2, которые реагировали с высокой аффинностью с крысиным белком MASP-2, были отобраны для скрининга методом ELISA. Эти высокоаффинные Fab2 были секвенированы для определения уникальности разных антител, и 50 уникальных анти-MASP-2 антител были очищены для дальнейшего анализа.

По 250 мкг каждого очищенного Fab2 антитела использовали для определения характеристик аффинности связывания MASP-2 и функционального тестирования пути комплемента. Результаты данного анализа приведены в ТАБЛИЦЕ 6.

ТАБЛИЦА 6: АНТИ-MASP-2 FAB2, КОТОРЫЕ БЛОКИРУЮТ ЛЕКТИНОВЫЙ ПУТЬ АКТИВАЦИИ КОМПЛЕМЕНТА

Fab2 антитело №	C3-Конвертаза (IC_{50} (нМ)	K_D	Расщепление C4 IC_{50} (нМ)
88	0,32	4,1	Н/О
41	0,35	0,30	0,81
11	0,46	0,86	<2 нМ
86	0,53	1,4	Н/О
81	0,54	2,0	Н/О
66	0,92	4,5	Н/О
57	0,95	3,6	<2 нМ
40	1,1	7,2	0,68
58	1,3	2,6	Н/О
60	1,6	3,1	Н/О
52	1,6	5,8	<2 нМ
63	2,0	6,6	Н/О
49	2,8	8,5	<2 нМ
89	3,0	2,5	Н/О
71	3,0	10,5	Н/О
87	6,0	2,5	Н/О
67	10,0	7,7	Н/О

Как показано выше в ТАБЛИЦЕ 6, из 50 протестированных анти-MASP-2 Fab2 были идентифицированы семнадцать Fab2 в качестве блокирующих MASP-2 Fab2, которые потенциально ингибируют образование C3-конвертазы с величиной IC_{50}, равной, или меньшей чем 10 нМ Fab2 (коэффициент положительных успешных находок 34%). Восемь из семнадцати идентифицированных Fab2 имеют величину IC_{50} в субнаномолярном диапазоне. Более того, все семнадцать из блокирующих MASP-2 Fab2, приведенных в ТАБЛИЦЕ 6, обеспечивают практически полное ингибирование образования C3-конвертазы в анализе на образование C3-конвертазы лектинового пути. На ФИГУРЕ 8A приведен график, показывающий результаты анализа образования C3-конвертазы для Fab2 антитела № 11, которое является репрезентативным для других протестированных Fab2 антител, результаты для которых приведены в ТАБЛИЦЕ 6. Это является важным соображением, поскольку теоретически возможно, что «блокирующие» Fab2 могут лишь частично ингибировать функцию MASP-2, даже, когда каждая молекула

MASP-2 связана с Fab2.

Хотя маннан является известным активатором лектинового пути, теоретически возможно, что наличие антител к маннану в крысиной сыворотке также может активировать классический путь и приводить к образованию C3b через C3-конвертазу классического пути. Однако каждое из семнадцати блокирующих анти-MASP-2 Fab2, перечисленных в данном примере, сильно ингибирует образование C3b (>95%), тем самым свидетельствуя о специфичности данного анализа для C3-конвертазы лектинового пути.

Анализы связывания также проводили со всеми семнадцатью блокирующими Fab2 для расчета кажущейся K_d для каждого из них. Результаты анализов связывания Fab2 против крысиного MASP-2 с естественным крысиным MASP-2 для шести из блокирующих Fab2 также приведены в ТАБЛИЦЕ 6. На ФИГУРЕ 8B приведен график, показывающий результаты анализа связывания с Fab2 антителом № 11. Аналогичные анализы связывания также проводили для других Fab2, и эти результаты приведены в ТАБЛИЦЕ 6. Как правило, величины кажущейся K_d, полученные для связывания каждого из шести Fab2 с «естественным» MASP-2, достаточно хорошо согласуются с IC_{50} для конкретных Fab2 в функциональном анализе для C3-конвертазы. Существует доказательство того, что MASP-2 претерпевает конформационные изменения из «неактивной» в «активную» форму при активации его протеазной активности (Feinberg et al., EMBO J 22:2348-59 (2003); Gal et al., J. Biol. Chem. 280:33435-44 (2005)). В нормальной крысиной плазме, используемой в анализе образования C3-конвертазы, MASP-2 присутствует преимущественно в «неактивной» конформации зимогена. Напротив, в анализе связывания MASP-2 присутствует в виде части комплекса с MBL, связанного с иммобилизованным маннаном; таким образом, MASP-2 находится в «активной» конформации (Petersen et al., J. Immunol Methods 257:107-16, 2001). Следовательно, не обязательно ожидать точного соответствия между IC_{50} и K_d для каждого из семнадцати протестированных блокирующих Fab2 в этих двух функциональных анализах, поскольку в каждом анализе Fab2 связывают разные конформационные формы MASP-2. Тем не менее, за исключением Fab2 № 88, по-видимому, имеет место достаточно близкое соответствие между IC_{50} и кажущейся K_d для каждого из остальных Fab2, протестированных в этих двух анализах (смотри ТАБЛИЦУ 6).

Несколько блокирующих Fab2 были протестированы на ингибирование опосредованного MASP-2 расщепления C4. На ФИГУРЕ 8C приведен график, показывающий результаты анализа расщепления C4, демонстрирующие ингибирование Fab2 № 41, с IC_{50}=0,81 нМ (смотри ТАБЛИЦУ 6). Как показано на ФИГУРЕ 9, все из протестированных Fab2 ингибировали расщепление C4 с величинами IC_{50}, аналогичными тем, которые получены в анализе для C3-конвертазы (смотри ТАБЛИЦУ 6).

Хотя маннан является известным активатором лектинового пути, теоретически возможно, что наличие антител к маннану в крысиной сыворотке также может активировать классический путь и приводить к образованию C4b за счет C1s-

опосредованного расщепления C4. Однако было идентифицировано несколько анти-MASP-2 Fab2, которые сильно ингибируют образование C4b (>95%), тем самым свидетельствуя о специфичности данного анализа для опосредованного MASP-2 расщепления C4. C4, подобно C3, содержит необычную и высоко реакционноспособную тиоэфирную группу в своей структуре. После расщепления C4 за счет MASP-2 в данном анализе тиоэфирная группа на C4b может образовывать ковалентную связь с гидроксильными или аминогруппами на макромолекулах, иммобилизованных на дне пластиковых лунок за счет сложноэфирных или амидных связей, это облегчает обнаружение C4b в анализе ELISA.

Результаты данных исследований четко показывают, что получены высокоаффинные Fab2 к крысиному белку MASP-2, которые функционально блокируют как расщепление C4, так и активность C3-конвертазы, тем самым предотвращая лектиновый путь активации.

Пример 11

В данном примере описано картирование эпитопов для нескольких блокирующих Fab2 антител против крысиного MASP-2, которые были получены, как описано в Примере 10.

Методы

Как показано на ФИГУРЕ 10, следующие белки, все с N-концевыми 6X His-метками, были экспрессированы в клетках CHO при помощи вектора pED4:

крысиный MASP-2A, полноразмерный белок MASP-2, инактивированный путем замены серина в активном центре на аланин (S613A);

крысиный MASP-2K, полноразмерный белок MASP-2, модифицированный для уменьшения аутоактивации (R424K);

CUBI-II, N-концевой фрагмент крысиного MASP-2, который содержит только домены CUBI, EGF-подобный и CUBII; и

CUBI/EGF-подобный, N-концевой фрагмент крысиного MASP-2, который содержит только домены CUBI и EGF-подобный.

Эти белки очищали из культуральных супернатантов аффинной хроматографией на колонке с никелем, как описано ранее (Chen et al., J. Biol. Chem. 276:25894-02 (2001)).

C-концевой полипептид (CCPII-SP), содержащий CCPII и домен сериновой протеазы крысиного MASP-2, был экспрессирован в E. coli в виде слитого белка с тиоредоксином с использованием pTrxFus (Invitrogen). Белок очищали из клеточных лизатов с использованием аффинной смолы Thiobond. Партнер по слиянию тиоредоксин был экспрессирован из пустого pTrxFus в качестве отрицательного контроля.

Все рекомбинантные белки диализовали в буфере TBS, и их концентрации определяли путем измерения OD при 280 нм.

Дот-блот анализ

Пять рекомбинантных полипептидов MASP-2, описанных выше и представленных на ФИГУРЕ 10, в серийных разведениях (и полипептид тиоредроксина в качестве

отрицательного контроля для полипептида CCPII-сериновая протеаза) точечно наносили на нитроцеллюлозную мембрану. Количество точечно нанесенного белка находилось в диапазоне от 100 нг до 6,4 пг, в пятикратных разведениях. В более поздних экспериментах количество точечно нанесенного белка находилось в диапазоне от 50 нг до 16 пг, опять-таки, в пятикратных разведениях. Мембраны блокировали 5% раствором порошкового нежирного молока в TBS (блокирующий буфер), затем инкубировали с анти-MASP-2 Fab2 с концентрацией 1,0 мкг/мл в блокирующем буфере (содержащем 5,0 мМ Ca^{2+}). Связанные Fab2 обнаруживали при помощи HRP-конъюгированных антител против Fab человека (AbD/Serotec; разведение 1/10000) и набора для обнаружения ECL (Amersham). Одну мембрану инкубировали с поликлональными Ат кролика против человеческого MASP-2 (описанными в Stover et al., J Immunol 163:6848-59 (1999)) в качестве положительного контроля. В этом случае связанные Ат обнаруживали при помощи HRP-конъюгированных антител козы против IgG кролика (Dako; разведение 1/2000).

Анализ связывания MASP-2

Планшеты для ELISA покрывали по 1,0 мкг/лунку рекомбинантным полипептидом MASP-2A или CUBI-II в карбонатном буфере (pH 9,0) в течение ночи при 4°C. Лунки блокировали 1% BSA в TBS, затем добавляли анти-MASP-2 Fab2 в серийном разведении в TBS, содержащем 5,0 мМ Ca^{2+}. Планшеты инкубировали в течение одного часа при RT. После трехкратного промывания TBS/Tween/Ca^{2+} добавляли HRP-конъюгированные антитела против Fab человека (AbD/Serotec), разведенные 1/10000 в TBS/Ca^{2+}, и планшеты инкубировали в течение еще одного часа при RT. Связанное антитело обнаруживали с использованием набора с субстратом пероксидазы TMB (Biorad).

Результаты

Результаты дот-блот анализа, демонстрирующие способность Fab2 взаимодействовать с разными полипептидами MASP-2, приведены ниже в ТАБЛИЦЕ 7**.** Числовые значения, приведенные в ТАБЛИЦЕ 7, показывают количество точечно нанесенного белка, необходимое для достижения примерно полумаксимальной силы сигнала. Как показано, все из полипептидов (за исключением отдельного партнера по слиянию тиоредоксина) были узнаны положительными контрольными Ат (поликлональная кроличья сыворотка против человеческого MASP-2).

ТАБЛИЦА 7: СПОСОБНОСТЬ К ВЗАИМОДЕЙСТВИЮ С РАЗЛИЧНЫМИ РЕКОМБИНАНТНЫМИ ПОЛИПЕПТИДАМИ КРЫСИНОГО MASP-2 В ДОТ-БЛОТ АНАЛИЗЕ

Fab2 Антитело №	MASP-2A	CUBI-II	CUBI/EGF-подобный	CCPII-SP	Тиоредоксин
40	0,16 нг	H/P	H/P	0,8 нг	H/P
41	0,16 нг	H/P	H/P	0,8 нг	H/P
11	0,16 нг	H/P	H/P	0,8 нг	H/P
49	0,16 нг	H/P	H/P	>20 нг	H/P

52	0,16 нг	H/P	H/P	0,8 нг	H/P
57	0,032 нг	H/P	H/P	H/P	H/P
58	0,4 нг	H/P	H/P	2,0 нг	H/P
60	0,4 нг	0,4 нг	H/P	H/P	H/P
63	0,4 нг	H/P	H/P	2,0 нг	H/P
66	0,4 нг	H/P	H/P	2,0 нг	H/P
67	0,4 нг	H/P	H/P	2,0 нг	H/P
71	0,4 нг	H/P	H/P	2,0 нг	H/P
81	0,4 нг	H/P	H/P	2,0 нг	H/P
86	0,4 нг	H/P	H/P	10 нг	H/P
87	0,4 нг	H/P	H/P	2,0 нг	H/P
Положительный контроль	<0,032 нг	0,16 нг	0,16 нг	<0,032 нг	H/P

H/P=нет реакции. Положительными контрольными антителами служила поликлональная кроличья сыворотка против человеческого MASP-2.

Все из Fab2 взаимодействовали с MASP-2A, а также MASP-2K (данные не представлены). Большинство Fab2 узнавали полипептид CCPII-SP, но не N-концевые фрагменты. Двумя исключениями были Fab2 № 60 и Fab2 № 57. Fab2 № 60 узнавал MASP-2A и фрагмент CUBI-II, но не полипептид CUBI/EGF-подобный домен или полипептид CCPII-SP, это указывает на то, что он связывает эпитоп в CUBII, или соединяющий CUBII и EGF-подобный домен. Fab2 № 57 узнавал MASP-2A, но ни один из протестированных фрагментов MASP-2, это указывает на то, что этот Fab2 узнает эпитоп в CCP1. Fab2 № 40 и № 49 связывали только полноразмерный MASP-2A. В анализе связывания методом ELISA, проиллюстрированном на ФИГУРЕ 11, Fab2 № 60 также связывал полипептид CUBI-II, хотя и с немного более низкой кажущейся аффинностью.

Эти результаты показывают, что были идентифицированы уникальные блокирующие Fab2 к нескольким областям белка MASP-2

Пример 12

В данном примере описан анализ мышей MASP-2-/- в мышиной модели почечной ишемии/реперфузии.

Предпосылки/обоснование

Ишемическое-реперфузионное (I/R) повреждение почек при температуре тела имеет отношение к ряду клинических состояний, включая гиповолемический шок, окклюзию почечной артерии и процедуры пережатия сосудов.

Ишемия-реперфузия (I/R) почек является важной причиной острой почечной недостаточности, связанной с уровнем смертности до 50% (Levy et al., JAMA 275:1489-94, 1996; Thadhani et al., N. Engl. J. Med. 334:1448-60, 1996). Пост-трансплантационная почечная недостаточность является распространенным и угрожающим жизни

осложнением после трансплантации почек (Nicholson et al., Kidney Int. 58:2585-91, 2000). Эффективное лечение I/R повреждения почек в настоящее время недоступно, и гемодиализ является единственным доступным лечением. Патофизиология I/R повреждения почек является сложной. Недавние исследования показали, что лектиновый путь активации комплемента может играть важную роль в патогенезе I/R повреждения почек (deVries et al., Am. J. Path. 165:1677-88, 2004).

Методы

Мышей MASP-2(-/-) получали, как описано в примере 1, и проводили их возвратное скрещивание в течение по меньшей мере 10 поколений с C57Bl/6. Шести самцам MASP-2(-/-) и шести мышам дикого типа (+/+) с массой тела 22-25 г вводили внутрибрюшинной инъекцией гипновел (6,64 мг/кг; Roche products Ltd. Welwyn Garden City, UK), а затем применяли анестезию путем ингаляции изофлурана (Abbott Laboratories Ltd., Kent, UK). Изофлуран был выбран, поскольку он представляет собой мягкий ингаляционный анестетик с минимальной токсичностью для печени; концентрации соблюдаются точно, и животное восстанавливается быстро, даже после продолжительной анестезии. Гипновел вводили, поскольку он вызывает состояние нейролептаналгезии у животного, и это означает, что нужно вводить меньше изофлурана. Животное помещали на теплую подложку для поддержания постоянной температуры тела. Затем производили срединный разрез живота и открывали полость тела с помощью пары ретракторов. Соединительную ткань удаляли выше и ниже почечной вены и артерии правой и левой почек, и почечную ножку зажимали с помощью зажимов для микроаневризмы в течение 55 минут. Продолжительность этого периода ишемии изначально была основана на предыдущем исследовании, проведенном в данной лаборатории (Zhou et al., J. Clin. Invest. 105:1363-71 (2000)). Кроме того, стандартное время ишемии 55 минут было выбрано после титрования ишемии, при котором было обнаружено, что 55 минут приводят к стойкому повреждению, которое также является обратимым, с низкой смертностью, менее 5%. После окклюзии 0,4 мл теплого солевого раствора (37°C) вносили в брюшную полость, а затем брюшную полость закрывали на период ишемии. После удаления зажимов для микроаневризмы почки наблюдали до изменения цвета, являющегося признаком повторного притока крови к почкам. Еще 0,4 мл теплого солевого раствора вносили в брюшную полость, и отверстие зашивали, после чего животных возвращали в их клетки. Образцы крови из хвостовой вены собирали через 24 часа после снятия зажимов, а через 48 часов мышей умерщвляли и собирали дополнительные образцы крови.

Оценка повреждения почек

Почечную функцию оценивали через 24 и 48 часов после реперфузии у шести самцов мышей MASP-2(-/-) и шести мышей ДТ (+/+). Определение креатинина в крови проводили методом масс-спектрометрии, получая воспроизводимый показатель почечной функции (чувствительность <1,0 мкмоль/л). На ФИГУРЕ 12 графически представлен клиренс азота мочевины крови для контролей C57Bl/6 дикого типа и мышей MASP-2 (-/-)

через 24 часа и 48 часов после реперфузии. Как показано на ФИГУРЕ 12, у мышей MASP-2(-/-) наблюдалось значительное уменьшение количества мочевины в крови через 24 и 48 часов, в сравнении с контрольными мышами дикого типа, это указывало на защитный функциональный эффект против повреждения почек в модели ишемического-реперфузионного повреждения.

В целом увеличение мочевины в крови наблюдалось как у мышей ДТ (+/+), так и у мышей MASP-2 (-/-), через 24 и 48 часов после хирургической процедуры и ишемического инсульта. Уровень мочевины в крови у животного ДТ (+/+) после операции без ишемии, как было определено отдельно, составляет 5,8 ммоль/л. Помимо данных, представленных на ФИГУРЕ 12, у одного животного MASP-2 (-/-) наблюдали почти полную защиту от ишемического инсульта, с показателями 6,8 и 9,6 ммоль/л через 24 и 48 часов, соответственно. Это животное было исключено из группового анализа, как потенциальный аномальный результат, при котором ишемическое повреждение могло отсутствовать. Таким образом, в окончательный анализ, результаты которого представлены на ФИГУРЕ 12, были включены 5 мышей MASP-2(-/-)и 6 мышей ДТ (+/+), и у мышей MASP-2 (-/-) имело место статистически значимое уменьшение мочевины в крови через 24 и 48 часов (критерий Стьюдента $p<0,05$). Эти результаты указывают на то, что ингибирование активности MASP-2 предположительно может иметь защитный или терапевтический эффект при повреждении почек вследствие ишемии.

Пример 13

В данном примере описаны результаты для мышей MASP-2-/- в мышиной модели дегенерации желтого пятна.

Предпосылки/обоснование

Возрастная дегенерация желтого пятна (AMD) является основной причиной слепоты у людей старше 55 лет в промышленно развитых странах. AMD имеет две основные формы: неоваскулярная (влажная) AMD и атрофическая (сухая) AMD. На неоваскулярную (влажную) форму приходится 90% серьезных нарушений зрения, связанных с AMD, хотя только у ~20% людей с AMD развивается влажная форма. Клинические признаки AMD включают множественные друзы, географическую атрофию и хориоидальную неоваскуляризацию (CNV). В декабре 2004 г. FDA одобрило макуген (пегаптаниб), представитель нового класса офтальмологических лекарственных средств, специфически направленных и блокирующих эффекты фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), для лечения влажной (неоваскулярной) формы AMD (Ng et al., Nat Rev. Drug Discov 5:123-32 (2006)). Хотя применение макугена является многообещающим новым методом лечения для подгруппы пациентов с AMD, сохраняется острая необходимость в разработке дополнительных методов лечения этого сложного заболевания. Многочисленные независимые линии исследования указывают на центральную роль активации комплемента в патогенезе AMD. Патогенез хориоидальной неоваскуляризации (CNV), наиболее серьезной формы AMD, может включать пути активации комплемента.

Более двадцати пяти лет назад Ryan описал индуцируемую лазером

травматическую модель CNV у животных (Ryan, S.J., Tr. Am. Opth. Soc. LXXVII:707-745, 1979). Эта модель исходно была разработана с использованием макак-резусов, однако с тех пор эта же технология была использована для разработки аналогичных моделей CNV у различных лабораторных животных, включая мышей (Tobe et al., Am. J. Pathol. 153:1641-46, 1998). В данной модели лазерную фотокоагуляцию используют для разрушения мембраны Бруха, что приводит к образованию CNV-подобных мембран. Индуцируемая лазером модель воспроизводит многие важные особенности состояния у человека (для недавнего обзора, смотри Ambati et al., Survey Ophthalmology 48:257-293, 2003). Индуцируемая лазером модель заболевания на мышах в настоящее время хорошо изучена и используется в качестве экспериментальной основы в большом, и постоянно растущем, числе исследовательских проектов. Общепринято, что индуцированная лазером модель обладает достаточным биологическим сходством с CNV у человека, чтобы доклинические исследования патогенеза и лекарственного ингибирования заболевания с использованием данной модели были полезны для лечения CNV у человека.

Методы

Мышей MASP-2(-/-) получали, как описано в примере 1, и проводили их возвратное скрещивание в течение по меньшей мере 10 поколений с C57Bl/6**.** В настоящем исследовании сравнивали результаты оценки самцов мышей MASP-2 (-/-) и MASP-2 (+/+) в ходе развития индуцированной лазером CNV, ускоренной модели неоваскулярной AMD, на основании объема индуцированной лазером CNV, определяемого методом сканирующей лазерной конфокальной микроскопии, в качестве меры повреждения тканей, и с определением уровней VEGF, сильного ангиогенного фактора, вовлеченного в CNV, в пигментном эпителии сетчатки (RPE)/сосудистой оболочке методом ELISA после индуцированного лазером повреждения.

Индукция хориоидальной неоваскуляризации (CNV)

Лазерную фотокоагуляцию (532 нм, 200 мВт, 100 мс, 75 мкм; Oculight GL, Iridex, Mountain View, CA) проводил в обоих глазах каждого животного в день ноль один человек, не осведомленный о принадлежности животных к конкретным экспериментальным группам. Лазерные пятна были нанесены стандартным способом вокруг зрительного нерва, с использованием щелевой лампы и покровного стекла в качестве контактной линзы. Морфологическим конечным результатом лазерного повреждения было появление кавитационного пузырька, признака, который, как считают, коррелирует с разрушением мембраны Бруха. Более подробно методы и оцениваемые критерии эффективности приведены далее.

Флуоресцентная ангиография

Флуоресцентную ангиографию поводили с использованием камеры и системы визуализации (камера TRC 50 1A; система ImageNet 2.01; Topcon, Paramus, NJ) через 1 неделю после лазерной фотокоагуляции. Фотографии получали с использованием 20-D линзы, контактирующей с линзой фундус-камеры, после внутрибрюшинной инъекции 0,1 мл 2,5% раствора флуоресцеина натрия. Специалист по сетчатке, не участвующий в

лазерной фотокоагуляции или ангиографии, оценивал флуоресцентные ангиограммы за один сеанс, не имея информации об экспериментальных группах.

Объем хориоидальной неоваскуляризации (CNV)

Через неделю после индуцированного лазером повреждения глаза энуклеировали и фиксировали 4% параформальдегидом в течение 30 мин при 4°C. Глазные чаши получали путем удаления передних сегментов и трижды промывали в PBS, с последующей дегидратацией и регидратацией в метаноле с разной концентрацией. После блокирования два раза буфером (PBS, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина и 0,5% Triton X-100) в течение 30 минут при комнатной температуре, глазные чаши инкубировали в течение ночи при 4°C с 0,5% раствором FITC-изолектина B4 (Vector laboratories, Burlingame, CA) в PBS, содержащим 0,2% BSA и 0,1% Triton X-100, который связывает концевые остатки β-D-галактозы на поверхности эндотелиальных клеток и избирательно метит мышиную сосудистую сеть. После двух промываний PBS, содержащим 0,1% Triton X-100, нейросенсорную сетчатку осторожно отслаивали и отделяли от зрительного нерва. Производили четыре расслабляющих радиальных надреза, оставшийся комплекс RPE-сосудистая оболочка-склера раскладывали плоско на предметном стекле в среде, препятствующей выгоранию флуоресценции (Immu-Mount Vectashield Mounting Medium; Vector laboratories), и накрывали покровным стеклом.

Плоские препараты изучали под сканирующим лазерным конфокальным микроскопом (TCS SP; Leica, Heidelberg, Germany). Сосуды визуализировали путем возбуждения синего излучения аргона с длиной волны 488 нм и поглощения излучения при длине волны от 515 до 545 нм. Использовали 40X масляно-иммерсионный объектив для всех исследований с визуализацией. Горизонтальные глазные срезы (с шагом 1 мкм) получали с поверхности комплекса RPE-сосудистая оболочка-склера. Самую глубокую фокальную плоскость, в которой могла быть идентифицирована окружающая хориоидальная сосудистая сеть, соединяющаяся с лезией, считали дном лезии. Любой сосуд в области лазерного поражения, поверхностный относительно этой эталонной плоскости, считали CNV. Изображения каждого среза сохраняли в цифровом формате. Площадь связанной с CNV флуоресценции измеряли путем компьютерного анализа изображений с использованием программного обеспечения микроскопа (TCS SP; Leica). Сумму всей площади флуоресценции в каждом горизонтальном срезе использовали в качестве показателя объема CNV. Визуализацию выполнял оператор, не осведомленный об экспериментальных группах.

Ввиду вероятности того, что на каждую индуцированную лазером лезию, приводящую к развитию CNV, влияет группа, к которой она относится (мышь, глаз и лазерное пятно), средние объемы лезий сравнивали с использованием линейной смешанной модели, применяя метод расщепленной делянки с повторным планом измерений. Фактором целой делянки была генетическая группа, к которой относится животное, в то время как фактором расщепленной делянки был глаз. Статистическую значимость определяли на уровне 0,05. Апостериорные сравнения средних значений

проводили с использованием поправки Бонферрони для множественных сравнений.

ELISA для VEGF.

Через три дня после повреждающего нанесения 12 лазерных пятен комплекс RPE-сосудистая оболочка обрабатывали ультразвуком в лизирующем буфере (20 мМ имидазол HCl, 10 мМ KCl, 1 мМ $MgCl_2$, 10 мМ ЭГТА, 1% Triton X-100, 10 мМ NaF, 1 мМ Na молибдат и 1 мМ ЭДТА с ингибиторами протеаз) на льду в течение 15 мин. Уровни белка VEGF в супернатанте определяли с использованием набора реактивов для ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN), которые узнают все сплайсированные варианты, при длине волны 450-570 нм (Emax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA) и нормировали на общий уровень белка. Измерения в двух повторах производил не осведомленный об экспериментальных группах оператор, не участвующий в экспериментах по фотокоагуляции, визуализации или ангиографии. Значения для VEGF представляли в виде среднего значения ± SEM из по меньшей мере трех независимых экспериментов и сравнивали с использованием U-критерия Манна-Уитни. Нулевую гипотезу отвергали при $P<0,05$.

Результаты

Оценка уровней VEGF

На ФИГУРЕ 13A приведен график, показывающий уровни белка VEGF в комплексе RPE-сосудистая оболочка, выделенном у мышей C57Bl6 дикого типа и мышей MASP-2(-/-) в день ноль. Как показано на ФИГУРЕ 13A, оценка уровней VEGF свидетельствует о снижении исходных уровней VEGF у мышей MASP-2 (-/-) в сравнении с контрольными мышами C57Bl6 дикого типа. На ФИГУРЕ 13B приведен график, показывающий уровни белка VEGF, измеренные в день три после индуцированного лазером повреждения. Как показано на ФИГУРЕ 13B, уровни VEGF были значительно повышены у мышей дикого типа (+/+) через три дня после индуцированного лазером повреждения, что согласуется с опубликованными данными (Nozaki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:2328-33 (2006)). Однако у мышей MASP-2 (-/-) наблюдали удивительно низкие уровни VEGF.

Оценка хориоидальной неоваскуляризации (CNV)

Помимо уменьшения уровней VEGF после индуцированной дегенерации желтого пятна оценивали площадь CNV до и после индуцированного лазером повреждения. На ФИГУРЕ 14 графически представлен объем CNV, измеренный у мышей C57bl дикого типа и мышей MASP-2(-/-) в день семь после индуцированного лазером повреждения. Как показано на ФИГУРЕ 14, у мышей MASP-2 (-/-) имело место уменьшение на примерно 30% площади CNV в день семь после индуцированного лазером повреждения в сравнении с контрольными мышами дикого типа.

Эти результаты свидетельствуют об уменьшении уровней VEGF и CNV у мышей MASP (-/-) в сравнении с контрольными мышами дикого типа (+/+), и о том, что блокада MASP-2 ингибитором может иметь превентивный и терапевтический эффект при лечении дегенерации желтого пятна.

Пример 14

В данном примере показано, что активация тромбина может происходить после активации лектинового пути в физиологических условиях, и показана степень участия MASP-2. В нормальной крысиной сыворотке активация лектинового пути приводит к активации тромбина (оцениваемой на основании отложения тромбина) одновременно с активацией комплемента (оцениваемой на основании отложения C4). Как можно видеть на ФИГУРАХ 15A и 15B, активация тромбина в данной системе ингибируется блокирующим MASP-2 антителом (формата Fab2), с кривой зависимости ингибирования от концентрации (ФИГУРА 15B), которая параллельна таковой для активации комплемента (ФИГУРА 15A). Эти данные свидетельствуют о том, что активация лектинового пути, имеющая место при травме, приводит к активации как системы комплемента, так и системы коагуляции, в процессе, который полностью зависит от MASP-2. Следовательно, блокирующие MASP2 антитела могут оказаться эффективными для уменьшения избыточной системной коагуляции, например, диссеминированной внутрисосудистой коагуляции, которая является одним из факторов, приводящих к смерти в случаях серьезной травмы.

Пример 15

В данном примере приведены результаты, полученные с использованием локализованной реакции Шварцмана, являющейся моделью диссеминированной внутрисосудистой коагуляции («DIC»), у мышей с дефицитом MASP-2 (-/-) и мышей с нормальным уровнем MASP-2 (+/+) для оценки роли лектинового пути при DIC.

Предпосылки/обоснование

Как описано выше, блокирование MASP-2 ингибирует активацию лектинового пути и приводит к уменьшению образования обоих анафилатоксинов, C3a и C5a. Анафилатоксины C3a, как показано, являются сильными факторами, вызывающими агрегацию тромбоцитов, in vitro, но их роль in vivo менее изучена, и высвобождение веществ тромбоцитов и плазмина при заживлении ран может лишь вторично вовлекать C3 комплемента. В данном примере роль лектинового пути анализировали у мышей MASP-2 (-/-) и мышей ДТ (+/+) для определения того, необходимо ли продолжительное повышение активации C3 для развития диссеминированной внутрисосудистой коагуляции.

Методы

Мышей MASP-2(-/-) получали, как описано в примере 1, и проводили их возвратное скрещивание в течение по меньшей мере 10 поколений с C57Bl/6**.**

В данном эксперименте использовали модель локализованной реакции Шварцмана. Локализованная реакция Шварцмана (LSR) представляет собой индуцированный липополисахаридом (LPS) ответ с хорошо охарактеризованным вкладом клеточных и гуморальных элементов врожденной иммунной системы. Зависимость LSR от комплемента хорошо известна (Polak, L., et al., Nature 223:738-739 (1969); Fong J.S. et al., J Exp Med 134:642-655 (1971)). В модели LSR мышей примировали в течение 4 часов TNF-альфа (500 нг, внутримошоночно), мышей подвергали анестезии и подготавливали для

прижизненной микроскопии мышцы, поддерживающей яичко. Для наблюдения были выбраны сети посткапиллярных венул (диаметром 15-60 мкм) с хорошим кровотоком (1-4 мм/с). Животным вводили флуоресцентные антитела для избирательного мечения нейтрофилов или тромбоцитов. Сеть сосудов последовательно сканировали, и изображения всех сосудов записывали в цифровом формате для последующего анализа. После записи исходного состояния микроциркуляции мыши получали одну внутривенную инъекцию LPS (100 мкг), либо отдельно, либо в сочетании со средствами, перечисленными ниже. Затем ту же сеть сосудов сканировали каждые 10 минут в течение 1 часа. Специфическое накопление флуорофоров определяли путем вычитания фонового уровня флуоресценции, и изображение улучшали за счет установки порога изображения. Величину реакций определяли на основании записанных изображений. Основной мерой реакций Шварцмана были совокупные данные.

В исследовании сравнивали мышей с нормальным уровнем MASP-2 (+/+), или дикого типа, а также мышей, подвергнутых воздействию либо известного деплеторного средства для пути комплемента, фактора яда кобры (CVF), либо ингибитора терминального компонента комплемента (антагониста C5aR). Результаты (ФИГУРА 16A) показывают, что как CVF, так и антагонист C5aR, предотвращают появление агрегатов в сосудистой сети. Кроме того, у мышей с дефицитом MASP-2 (-/-) (ФИГУРА 16B) также наблюдали полное ингибирование локализованной реакции Шварцмана, что указывало на вовлеченность лектинового пути. Эти результаты четко показывают роль MASP-2 в развитии DIC и свидетельствуют в пользу использования ингибиторов MASP-2 для лечения и предотвращения DIC.

Пример 16

В данном примере описан анализ мышей MASP-2 (-/-) в мышиной модели трансплантации почки.

Предпосылки/обоснование

Роль MASP-2 в функциональных последствиях трансплантации почки оценивали с использованием мышиной модели.

Методы

Функциональные последствия трансплантации почки оценивали с использованием одного изотрансплантата почки односторонне нефрэктомизированным мышам-реципиентам, шести получающим трансплантат мышам ДТ (+/+) (B6) и шести получающим трансплантат мышам MASP-2 (-/-). Для оценки функции трансплантированной почки оставшуюся естественную почку удаляли реципиентам через 5 дней после трансплантации, и почечную функцию оценивали через 24 часа путем измерения уровней азота мочевины крови (BUN).

Результаты

На ФИГУРЕ 17 приведен график, показывающий уровни азота мочевины крови (BUN) через 6 дней после трансплантации почки у реципиентов ДТ (+/+) и реципиентов MASP-2 (-/-). Как показано на ФИГУРЕ 17, сильно повышенные уровни BUN наблюдали у

реципиентов трансплантата мышей ДТ (+/+) (B6) (нормальные уровни BUN у мышей составляют <5 мМ), что указывало на почечную недостаточность. Напротив, у реципиентов изотрансплантата мышей MASP-2 (-/-) наблюдали значительно более низкие уровни BUN, что свидетельствовало об улучшенной почечной функции. Следует отметить, что данные результаты были получены с использованием трансплантатов от доноров почек ДТ (+/+), это указывало на то, что отсутствие функционального лектинового пути только у реципиента транспланата является достаточным для достижения благоприятного терапевтического результата.

В совокупности данные результаты показывают, что ингибирование лектинового пути за счет ингибирования MASP-2 представляет собой способ уменьшения заболеваемости и продления функционирования трансплантата при трансплантации почки, и что данный подход, судя по всему, будет полезным в других вариантах трансплантации.

Пример 17

В данном примере показано, что мыши MASP-2 (-/-) являются устойчивыми к септическому шоку в мышиной модели полимикробного септического перитонита.

Предпосылки/обоснование

Для оценки потенциальных эффектов MASP-2 (-/-) при инфекции использовали перевязку и прокол слепой кишки (CLP), модель полимикробного септического перитонита. Эту модель считают наиболее точным отражением процессов, происходящих при септическом перитоните человека. Перевязка и прокол слепой кишки (CLP) представляет собой модель, в которой слепую кишку перевязывают и прокалывают иглой, что приводит к постоянной утечке в брюшную полость бактерий, которые попадают в кровь через лимфодренаж и затем распределяются по всем органам брюшной полости, что приводит к полиорганной недостаточности и септическому шоку (Eskandari et al., J Immunol 148(9):2724-2730 (1992)). Модель CLP имитирует протекание сепсиса у пациентов и индуцирует ранний гипервоспалительный ответ, с последующей выраженной гиповоспалительной фазой. Во время этой фазы животные являются в высокой степени чувствительными к бактериальному заражению (Wichterman et al., J. Surg. Res. 29(2):189-201 (1980)).

Методы

Смертность в результате полимикробной инфекции с использованием модели перевязки и прокола слепой кишки (CLP) изучали на мышах ДТ (+/+) (n=18) и мышах MASP-2 (-/-) (n=16). Вкратце, мышей с дефицитом MASP-2 и их однопометников дикого типа анестезировали, слепую кишку выводили на поверхность тела и перевязывали в участке на 30% выше дистального конца. После этого слепую кишку прокалывали один раз иглой диаметром 0,4 мм. Затем слепую кишку возвращали в брюшную полость и разрез в коже закрывали зажимами. Выживаемость мышей, подвергнутых CLP, контролировали в течение 14 дней после CLP. Перитонеальный лаваж собирали у мышей через 16 часов после CLP для измерения бактериальной нагрузки. Готовили серийные

разведения перитонеального лаважа в PBS и инокулировали в чашки со средой Мюллера-Хинтона, с последующей инкубацией при 37°C в анаэробных условиях в течение 24 часов, после чего определяли бактериальную нагрузку. Также измеряли ответ на бактериальную инфекцию в виде продуцирования TNF-альфа у мышей ДТ (+/+) и MASP-2 (-/-) через 16 часов после CLP в легких и селезенке методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (кРВ-ПЦР). Сывороточный уровень TNF-альфа через 16 часов после CLP у мышей ДТ (+/+) и MASP-2 (-/-) также количественно определяли методом ELISA в формате сэндвич.

Результаты

На ФИГУРЕ 18 графически представлена выживаемость, в процентах, подвергнутых CLP животных в зависимости от количества дней после процедуры CLP. Как показано на ФИГУРЕ 18, отсутствие лектинового пути у мышей MASP-2 (-/-) не приводит к увеличению смертности мышей после полимикробной инфекции в модели перевязки и прокола слепой кишки, в сравнении с мышами ДТ (+/+). Однако, как показано на ФИГУРЕ 19, у мышей MASP-2 (-/-) наблюдали гораздо более высокую бактериальную нагрузку (увеличение примерно в 1000 раз по числу бактерий) в перитонеальном лаваже после CLP в сравнении с их однопометниками ДТ (+/+). Эти результаты показывают, что мыши с дефицитом MASP-2 (-/-) являются устойчивыми к септическому шоку. Меньший клиренс бактерий у мышей с дефицитом MASP-2 в данной модели может быть следствием нарушенного C3b-опосредованного фагоцитоза, поскольку было показано, что отложение C3 зависит от MASP-2.

Было установлено, что ответ на бактериальную инфекцию в виде продуцирования цитокина TNF-альфа не был повышен у мышей MASP-2 (-/-) в сравнении с контролями ДТ (+/+) (данные не представлены). Также было показано, что имела место значительно более высокая сывороточная концентрация TNF-альфа у мышей ДТ (+/+) через 16 часов после CLP, в отличие от мышей MASP-2 (-/-), у которых сывороточный уровень TNF-альфа оставался практически неизменным. Эти результаты свидетельствуют о том, что интенсивный воспалительный ответ на септическое состояние был смягчен у мышей MASP-2 (-/-), что позволяло животным выживать при наличии большого количества бактерий.

В совокупности данные результаты демонстрируют потенциальные вредные эффекты лектинового пути активации комплемента в случае септицемии и повышенной смертности у пациентов с генерализованным сепсисом. Эти результаты также показывают, что дефицит MASP-2 приводит к модуляции воспалительного иммунного ответа и уменьшению уровней экспрессии воспалительных медиаторов при сепсисе. Таким образом, можно предположить, что ингибирование MASP-2 (-/-) путем введения ингибирующих моноклональных антител против MASP-2 было бы эффективным для уменьшения воспалительного ответа у субъекта, страдающего от септического шока.

Пример 18

В данном примере описан анализ мышей MASP-2 (-/-) в мышиной модели

интраназальной инфекционности.

Предпосылки/обоснование

Pseudomonas aeruginosa представляет собой грамотрицательный оппортунистический бактериальный патоген человека, который вызывает различные инфекции, особенно у людей с ослабленным иммунитетом. Эта бактерия является основным источником приобретенных внутрибольничных инфекций, в частности, больничной пневмонии. Она также является причиной значительной заболеваемости и смертности у пациентов с кистозным фиброзом (CF). Легочная инфекция, вызываемая P. aeruginosa, характеризуется сильным рекрутингом нейтрофилов и значительным легочным воспалением, приводящим к сильному повреждению тканей (Palanki M.S. et al., J. Med. Chem 51:1546-1559 (2008)).

В данном примере описано исследование, предпринятое для определения того, повышает ли устранение лектинового пути у мышей MASP-2 (-/-) восприимчивость мышей к бактериальной инфекции.

Методы

Двадцать две мыши ДТ (+/+), двадцать две мыши MASP-2 (-/-) и одиннадцать мышей C3 (-/-) заражали путем интраназального введения штамма бактерий P. aeruginosa. Мышей наблюдали в течение шести дней после инфекции и строили график Каплана-Мейера, показывающий выживаемость в процентах.

Результаты

На ФИГУРЕ 20 представлен график Каплана-Мейера выживаемости, в процентах, мышей ДТ (+/+), MASP-2 (-/-) или C3 (-/-) через шесть дней после инфицирования. Как показано на ФИГУРЕ 20, отсутствовала разница между мышами MASP-2 (-/-) и мышами ДТ (+/+). Однако результатом устранения классического (C1q) пути комплемента у мышей C3 (-/-) являлась сильная восприимчивость к бактериальной инфекции. Эти результаты показывают, что ингибирование MASP-2 не повышает восприимчивость к бактериальной инфекции, свидетельствуя о том, что возможно уменьшать нежелательные воспалительные осложнения у травмированных пациентов путем ингибирования MASP-2 без уменьшения способности пациентов бороться с инфекциями за счет классического пути комплемента.

Пример 19

В данном примере описан фармакодинамический анализ репрезентативных высокоаффинных анти-MASP-2 Fab2 антител, идентифицированных, как описано в примере 10.

Предпосылки/обоснование

Как описано в примере 10, для идентификации высокоаффинных антител, блокирующих лектиновый путь у крыс, использовали крысиный белок MASP-2 для сортировки библиотеки фагового дисплея. Эта библиотека была спроектирована для обеспечения высокой степени иммунологического разнообразия, и была создана с использованием полностью человеческих последовательностей генов иммуноглобулинов.

Как описано в примере 10, было идентифицировано примерно 250 отдельных фаговых клонов, которые связывали с высокой аффинностью крысиный белок MASP-2 при проведении скрининга методом ELISA. Секвенирование этих клонов позволило идентифицировать 50 уникальных фагов, кодирующих анти-MASP-2 антитело. Белок Fab2 был экспрессирован из этих клонов, очищен и проанализирован на аффинность связывания MASP-2 и функциональное ингибирование лектинового пути комплемента.

Как показано в ТАБЛИЦЕ 6 примера 10, в результате этого анализа были идентифицированы 17 анти-MASP-2 Fab2 с блокирующей функцию активностью (коэффициент положительных успешных находок блокирующих антител 34%). Функциональное ингибирование лектинового пути комплемента Fab2 было очевидно на основании отложения C4, которое является прямым показателем расщепления C4 за счет MASP-2. Важно отметить, что ингибирование было в равной степени очевидным при оценке активности C3-конвертазы, указывая на функциональное блокирование лектинового пути комплемента. 17 блокирующих MASP-2 Fab2, идентифицированных, как описано в примере 10, сильно ингибируют образование C3-конвертазы с величинами IC_{50}, равными, или менее, 10 нМ. Восемь из 17 идентифицированных Fab2 имеют величину IC_{50} в субнаномолярном диапазоне. Кроме того, все 17 блокирующих MASP-2 Fab2 вызывают практически полное ингибирование образования C3-конвертазы в анализе образования C3-конвертазы лектинового пути, как показано на ФИГУРАХ 8A-C, и суммировано в ТАБЛИЦЕ 6 примера 10. Более того, каждое из 17 блокирующих анти-MASP-2 Fab2, приведенных в ТАБЛИЦЕ 6, сильно ингибирует образование C3b (>95%), таким образом, демонстрируя специфичность данного анализа для C3-конвертазы лектинового пути.

Изотипические варианты полноразмерных антител крысы IgG2c и мыши IgG2a были получены из Fab2 № 11. В данном примере описана in vivo характеризация данных изотипов в отношении фармакодинамических параметров.

Методы

Как описано в примере 10, крысиный белок MASP-2 был использован для сортировки фагово-дисплейной библиотеки Fab, из которой идентифицировали Fab2 № 11. Изотипические варианты полноразмерных антител крысы IgG2c и мыши IgG2a были получены из Fab2 № 11. Как крысиный IgG2c, так и мышиный IgG2a, изотипы полноразмерных антител были охарактеризованы in vivo в отношении фармакодинамических параметров следующим образом.

In vivo *исследование на мышах*

Проводили фармакодинамическое исследование на мышах для изучения эффекта введения анти-MASP-2 антитела на активность лектинового пути в плазме in vivo. В данном исследовании определяли отложение C4 ex vivo в анализе для лектинового пути в различные моменты времени после подкожного (п/к) и внутрибрюшинного (в/б) введения 0,3 мг/кг или 1,0 мг/кг мышиного анти-MASP-2 моАт (мышиное полноразмерное антитело изотипа IgG2a, полученное из Fab2 № 11).

На ФИГУРЕ 21 графически представлено характерное для лектинового пути отложение C4b, измеренное ex vivo в неразбавленных образцах сыворотки, полученных от мышей (n=3 мышей/группу) в разные моменты времени после подкожного введения дозы либо 0,3 мг/кг, либо 1,0 мг/кг, мышиного анти-MASP-2 моАт. Образцы сыворотки от мышей, собранные до введения антитела, служили в качестве отрицательных контролей (100% активность), при этом сыворотка, в которую добавляли in vitro то же блокирующее анти-MASP-2 антитело в концентрации 100 нМ, была использована в качестве положительного контроля (0% активности).

Результаты, представленные на ФИГУРЕ 21, показывают быстрое и полное ингибирование отложения C4b после подкожного введения дозы 1,0 мг/кг мышиного анти-MASP-2 моАт. Частичное ингибирование отложения C4b наблюдали после подкожного введения дозы 0,3 мг/кг мышиного анти-MASP-2 моАт.

Динамику восстановления лектинового пути контролировали в течение трех недель после однократного в/б введения мышам мышиного анти-MASP-2 моАт в дозе 0,6 мг/кг. Как показано на ФИГУРЕ 22, резкое падение активности лектинового пути происходило после введения антитела, с последующим полным ингибированием лектинового пути, которое продолжалось в течение примерно 7 дней после в/б введения. Медленное восстановление активности пути наблюдали в течение второй и третьей недель, с полным восстановлением лектинового пути у мышей через 17 дней после введения анти-MASP-2 моАт.

Эти результаты показывают, что мышиное анти-MASP-2 моАт, полученное из Fab2 № 11, при системной доставке ингибирует лектиновый путь у мышей зависимым от дозы образом.

Пример 20

В данном примере описан анализ эффективности мышиного анти-MASP-2 моАт, полученного из Fab2 № 11, в мышиной модели возрастной дегенерации желтого пятна.

Предпосылки/обоснование

Как описано в примере 10, крысиный белок MASP-2 был использован для сортировки фагово-дисплейной библиотеки Fab, из которой идентифицировали Fab2 № 11 в качестве функционально активного антитела. Из Fab2 № 11 были получены полноразмерные антитела крысы изотипа IgG2c и мыши изотипа IgG2a. Полноразмерное мышиное анти-MASP-2 антитело изотипа IgG2a было охарактеризовано в отношении фармакодинамических параметров, как описано в примере 19. В данном примере полноразмерное мышиное анти-MASP-2 антитело, полученное из Fab2 № 11, анализировали в мышиной модели возрастной дегенерации желтого пятна (AMD), описанной в Bora P.S. et al., J Immunol 174:491-497 (2005).

Методы

Мышиное полноразмерное анти-MASP-2 антитело изотипа IgG2a, полученное из Fab2 № 11, как описано в примере 19, тестировали в мышиной модели возрастной дегенерации желтого пятна (AMD), как описано в примере 13, со следующими

модификациями.

Введение мышиных анти-MASP-2 моАт

Две разные дозы (0,3 мг/кг и 1,0 мг/кг) мышиного анти-MASP-2 моАт, наряду с контрольным по изотипу моАт, вводили в/б инъекцией мышам ДТ (+/+) (n=8 мышей на группу) за 16 часов до индукции CNV.

Индукция хориоидальной неоваскуляризации (CNV)

Индукцию хориоидальной неоваскуляризации (CNV) и измерение объема CNV проводили методом лазерной фотокоагуляции, как описано в примере 13.

Результаты

На ФИГУРЕ 23 графически представлена площадь CNV, измеренная через 7 дней после индуцированного лазером повреждения у мышей, получавших либо контрольные по изотипу моАт, либо мышиные анти-MASP-2 моАт (0,3 мг/кг и 1,0 мг/кг). Как показано на ФИГУРЕ 23, у мышей, предварительно получавших дозу 1,0 мг/кг анти-MASP-2 моАт, наблюдали статистически значимое ($p < 0,01$) примерно 50% уменьшение CNV через семь дней после воздействия лазером. Как также показано на ФИГУРЕ 23, установлено, что доза 0,3 мг/кг анти-MASP-2 моАт была неэффективна для уменьшения CNV. Следует отметить, что доза 0,3 мг/кг анти-MASP-2 моАт, как показано, приводит к частичному и временному ингибированию отложения C4b после подкожного введения, как описано в примере 19 и показано на ФИГУРЕ 21.

Результаты, описанные в данном примере, демонстрируют, что блокирование MASP-2 ингибитором, таким как анти-MASP-2 моАт, оказывает превентивный и/или терапевтический эффект при лечении дегенерации желтого пятна. Также следует отметить, что эти результаты согласуются с результатами, полученными в проведенном на мышах MASP-2 (-/-) исследовании, описанном в примере 13, в котором наблюдали 30% уменьшение CNV через 7 дней после воздействия лазером у мышей MASP-2 (-/-), в сравнении с контрольными мышами дикого типа. Кроме того, результаты в данном примере также показывают, что системно доставляемое анти-MASP-2 антитело оказывает локальный терапевтический эффект в глазу, это подчеркивает возможность использования системного пути введения для лечения пациентов с AMD. Подводя итог, данные результаты предоставляют доказательства в пользу использования анти-MASP-2 моАт в лечении AMD.

Пример 21

В данном примере показано, что мыши с дефицитом MASP-2 защищены от вызываемой Neisseria meningitidis гибели после инфицирования N. meningitidis и имеют повышенный клиренс бактерий в сравнении контрольными мышами дикого типа.

Обоснование

Neisseria meningitidis является гетеротрофной грамотрицательной диплококковой бактерией, известной своей ролью в развитии менингита и других форм менингококковых заболеваний, например, менингококкемии. N. meningitidis является основной причиной заболеваемости и смертности в детском возрасте. Тяжелые осложнения включают

септицемию, синдром Уотерхауса-Фридрихсена, недостаточность надпочечников и диссеминированную внутрисосудистую коагуляцию (DIC). Смотри, например, Rintala E. et al., Critical Care Medicine 28(7):2373-2378 (2000). В данном примере роль лектинового пути анализировали у мышей MASP-2 (-/-) и ДТ (+/+) для выяснения того, будут ли мыши с дефицитом MASP-2 подвержены вызываемой N. meningitidis гибели.

Методы

Мышей с нокаутом MASP-2 получали, как описано в примере 1, и проводили их возвратное скрещивание в течение по меньшей мере 10 поколений с C57Bl/6**.** Мышам MASP-2 KO (n=10) и мышам C57/B6 дикого типа (n=10) в возрасте 10 недель вводили внутривенной инъекцией дозу 5×10^8 КОЕ/100 мкл, 2×10^8 КОЕ/100 мкл или 3×10^7 КОЕ/100 мкл Neisseria meningitidis серогруппы A Z2491 в 400 мг/кг комплексе железо-декстран. Выживаемость мышей после инфицирования контролировали в течение 72-часового периода времени. Образцы крови получали от мышей с часовыми интервалами после инфицирования и анализировали для определения сывороточного уровня (log КОЕ/мл) N. meningitidis с целью подтверждения инфекции и определения степени клиренса бактерий из сыворотки.

Результаты

На ФИГУРЕ 24A графически представлена выживаемость, в процентах, мышей MASP-2 KO и ДТ после введения инфекционной дозы 5×10^8/100 мкл КОЕ N. meningitidis. Как показано на ФИГУРЕ 24A, после инфицирования самой высокой дозой 5×10^8/100 мкл КОЕ N. meningitidis 100% мышей MASP-2 KO выживали в течение всего 72-часового периода наблюдения после инфицирования. Напротив, лишь 20% мышей ДТ были все еще живы через 24 часа после инфицирования. Эти результаты показывают, что мыши с дефицитом MASP-2 защищены от вызываемой N. meningitidis гибели.

На ФИГУРЕ 24B приведен график, показывающий log КОЕ/мл N. meningitidis, извлеченных в разные моменты времени из образцов крови, полученных от мышей MASP-2 KO и ДТ, инфицированных 5×10^8 КОЕ/100 мкл N. meningitidis. Как показано на ФИГУРЕ 24B, у мышей ДТ уровень N. meningitidis в крови достигал пикового значения примерно 6,5 log КОЕ/мл через 24 часа после инфицирования и падал до нуля через 48 часов после инфицирования. Напротив, у мышей MASP-2 KO уровень N. meningitidis достигал пикового значения примерно 3,5 log КОЕ/мл через 6 часов после инфицирования и падал до нуля через 36 часов после инфицирования.

На ФИГУРЕ 25A приведен график, показывающий выживаемость, в процентах, мышей MASP-2 KO и ДТ после инфицирования 2×10^8 КОЕ/100 мкл N. meningitidis. Как показано на ФИГУРЕ 25A, после инфицирования дозой 2×10^8 КОЕ/100 мкл N. meningitidis 100% мышей MASP-2 KO выживали в течение всего 72-часового периода наблюдения после инфицирования. Напротив, лишь 80% мышей ДТ были все еще живы через 24 часа после инфицирования. Согласуясь с результатами, показанными на ФИГУРЕ 24A, эти результаты также показывают, что мыши с дефицитом MASP-2 защищены от вызываемой N. meningitidis гибели.

На ФИГУРЕ 25B приведен график, показывающий log КОЕ/мл N. meningitidis, извлеченных в разные моменты времени из образцов крови, полученных от мышей ДТ, инфицированных 2×10^8 КОЕ/100 мкл N. meningitidis. Как показано на ФИГУРЕ 25B, уровень N. meningitidis в крови у мышей ДТ, инфицированных 2×10^8 КОЕ, достигал пикового значения примерно 4 log КОЕ/мл через 12 часов после инфицирования и падал до нуля через 24 часа после инфицирования. На ФИГУРЕ 25C приведен график, показывающий log КОЕ/мл N. meningitidis, извлеченных в разные моменты времени из образцов крови, полученных от мышей MASP-2 KO, инфицированных 2×10^8 КОЕ/100 мкл N. meningitidis. Как показано на ФИГУРЕ 25C, уровень N. meningitidis в крови мышей MASP-2 KO, инфицированных 2×10^8 КОЕ, достигал пикового значения примерно 3,5 log КОЕ/мл через 2 часа после инфицирования и падал до нуля через 3 часа после инфицирования. Согласуясь с результатами, показанными на ФИГУРЕ 24B, эти результаты демонстрируют, что хотя мыши MASP-2 KO были инфицированы такой же дозой N. meningitidis, что и мыши ДТ, у мышей MASP-2 KO имел место повышенный клиренс бактерий из крови в сравнении с мышами ДТ.

Выживаемость, в процентах, мышей MASP-2 KO и ДТ после инфицирования самой низкой дозой 3×10^7 КОЕ/100 мкл N. meningitidis, составляла 100% через 72 часа (данные не представлены).

Обсуждение

Полученные результаты показывают, что мыши с дефицитом MASP-2 защищены от вызываемой N. meningitidis гибели и имеют повышенный клиренс бактерий из крови в сравнении с мышами ДТ. Таким образом, учитывая эти результаты, ожидается, что терапевтическое применение ингибиторов MASP-2, таких как анти-MASP-2 моАт, будет эффективным для лечения, предотвращения или ослабления эффектов инфекции, вызываемой бактериями N. meningitidis (то есть, сепсиса и DIC). Кроме того, эти результаты показывают, что терапевтическое применение ингибиторов MASP-2, таких как анти-MASP-2 моАт, не будет предрасполагать субъекта к повышенному риску заражения N. meningitidis.

Пример 22

В данном примере описано открытие новой опосредованной лектиновым путем и зависимой от MASP-2 активации C3 комплемента в обход C4.

Обоснование

Основная терапевтическая польза от использования ингибиторов активации комплемента для ограничения ишемии/реперфузионного повреждения миокарда (MIRI) была убедительно продемонстрирована в экспериментальной крысиной модели инфаркта миокарда два десятилетия назад: рекомбинантный sCR1, растворимое укороченное производное клеточного поверхностного рецептора комплемента 1 типа (CR1), вводили внутривенно, и его эффект оценивали в крысиной in vivo модели MIRI. Введение sCR1 приводило к уменьшению объема инфаркта на более чем 40% (Weisman, H.F., et al., Science 249:146-151 (1990)). Терапевтический потенциал этого рекомбинантного

ингибитора впоследствии был продемонстрирован в клиническом испытании, в котором было показано, что введение sCR1 пациентам с MI предотвращало сократительную недостаточность в постишемическом сердце (Shandelya, S., et al., Circulation 87:536-546 (1993)). Однако основной механизм, приводящий к активации комплемента в ишемической ткани, не был окончательно выяснен, в основном из-за отсутствия соответствующих экспериментальных моделей, ограниченного понимания молекулярных процессов, приводящих к активации комплемента в лишенных кислорода клетках, а также взаимосвязи и синергизма между разными путями активации комплемента.

В качестве фундаментального компонента иммунного ответа система комплемента обеспечивает защиту от проникающих микроорганизмов за счет как зависимых, так и не зависимых, от антител механизмов. Она организует множество клеточных и гуморальных взаимодействий в процессе иммунного ответа, включая хемотаксис, фагоцитоз, адгезию клеток и В-клеточную дифференциацию. Три разных пути инициируют каскад комплемента: классический путь, альтернативный путь и лектиновый путь. В классическом пути подкомпонент узнавания C1q связывается с различными мишенями - преимущественно иммунными комплексами - инициируя поэтапную активацию связанных сериновых протеаз, C1r и C1s, которые обеспечивают основной механизм клиренса патогена и иммунного комплекса после вовлечения адаптивной иммунной системы. Связывание C1q с иммунными комплексами приводит к превращению димера зимогена C1r в его активную форму для расщепления и, тем самым, активации C1s. C1s переводит связывание C1q в активацию комплемента в двух этапах расщепления: сначала он превращает C4 в C4a и C4b, а затем расщепляет связанный с C4b C2, с образованием C3-конвертазы C4b2a. Этот комплекс превращает компонент C3, в изобилии присутствующий в плазме, в C3a и C3b. Накопление C3b в непосредственной близости от комплекса C4b2a приводит к смещению субстратной специфичности с C3 на C5, с образованием C5-конвертазы $C4b2a(C3b)_n$. Комплексы C3 и C5-конвертазы, полученные через классический путь активации, идентичны тем, которые получены в лектиновом пути активации. В альтернативном пути спонтанный низкоуровневый гидролиз компонента C3 приводит к отложению белковых фрагментов на клеточных поверхностях, запуская активацию комплемента на чужеродных клетках, в то время как связанные с клетками регуляторные белки на тканях хозяина предотвращают активацию, таким образом предотвращая саморазрушение. Подобно альтернативному пути, лектиновый путь может активироваться в отсутствие иммунных комплексов. Активация инициируется связыванием мультимолекулярного комплекса активации лектинового пути с патоген-ассоциированным молекулярным паттерном (**P**athogen-**A**ssociated **M**olecular **P**atterns (PAMP)), преимущественно углеводными структурами, присутствующими на бактериальных, грибковых или вирусных патогенах, или с аберрантными паттернами гликозилирования на апоптотических, некротических, злокачественных или лишенных кислорода клетках (Collard, C.D., et al., Am. J. Pathol. 156:1549-1556 (2000); Walport, M.J., N. Engl. J. Med. 344:1058-1066 (2001); Schwaeble, W., et al., Immunobiology 205:455-466

(2002); и Fujita, T., Nat. Rev. Immunol. 2:346-353 (2002)).

Маннан-связывающий лектин (MBL) был первым узнающим углевод подкомпонентом, который, как показано, образует комплексы с группой новых сериновых протеаз, называемых MBL-ассоциированными сериновыми протеазами (MASP) и пронумерованных в порядке их открытия (то есть, MASP-1, MASP-2 и MASP-3). У человека комплексы активации лектинового пути могут быть образованы с четырьмя альтернативными узнающими углевод подкомпонентами с разными специфичностями в отношении связываемых углеводов, то есть, 2 MBL, и тремя разными представителями семейства фиколинов, а именно, L-фиколином, H-фиколином и M-фиколином, а также MASP. Две формы MBL, MBL A и MBL C, и фиколин-A образуют комплексы активации лектинового пути с MASP в плазме мышей и крыс. Авторы изобретения ранее клонировали и охарактеризовали MASP-2 и дополнительный укороченный продукт гена MASP-2 размером 19 кДа, названный MAp19 или sMAP, у человека, мыши и крысы (Thiel, S., et al., Nature 386:506-510 (1997); Stover, C.M., et al., J. Immunol. 162:3481-3490 (1999); Takahashi, M., et al., Int. Immunol. 11:859-863 (1999); и Stover, C.M., et al., J. Immunol. 163:6848-6859 (1999)). MAp19/sMAP лишен протеазной активности, однако может регулировать активацию лектинового пути, конкурируя с MASP за связывание с узнающими углеводы комплексами (Iwaki, D. et al., J. Immunol. 177:8626-8632 (2006)).

Существуют доказательства того, что из трех MASP лишь MASP-2 необходим для перевода связывания узнающих комплексов лектинового пути в активацию комплемента (Thiel, S., et al. (1997); Vorup-Jensen, T., et al., J. Immunol. 165:2093-2100 (2000); Thiel, S., et al., J. Immunol. 165:878-887 (2000); Rossi, V., et al., J. Biol. Chem. 276:40880-40887 (2001)). Этот вывод подтверждается фенотипом недавно описанной линии мышей с дефицитом MASP-1 и MASP-3. За исключением задержки начала опосредованной лектиновым путем активации комплемента in vitro мыши с дефицитом MASP-1/3 сохраняют функциональную активность лектинового пути. Добавление в сыворотку, дефицитную по MASP-1 и MASP-3, рекомбинантного MASP-1 позволяет преодолеть эту задержку в активации лектинового пути, из чего можно предположить, что MASP-1 может облегчать активацию MASP-2 (Takahashi, M., et al., J. Immunol. 180:6132-6138 (2008)). В недавнем исследовании было продемонстрировано, что MASP-1 (и возможно также MASP-3) необходим для превращения фермента активации альтернативного пути фактора D из его формы зимогена в ферментативно активную форму (Takahashi M. et al., J Exp Med 207(1):29-37 (2010)). Физиологическая важность этого процесса подчеркивается отсутствием функциональной активности альтернативного пути в плазме у мышей с дефицитом MASP-1/3.

У недавно полученных линий мышей с комбинированным направленным дефицитом узнающих углевод подкомпонентов лектинового пути MBL A и MBL C все еще может инициироваться активация лектинового пути через оставшийся узнающий подкомпонент лектинового пути у мышей, фиколин A (Takahashi, K., et al., Microbes Infect. 4:773-784 (2002)). Отсутствие какой-либо остаточной функциональной активности

лектинового пути у мышей с дефицитом MASP-2 позволяет иметь убедительную модель для изучения роли этой эффекторной ветви врожденного гуморального иммунитета в здоровом состоянии и в болезни.

Наличие линий мышей с дефицитом C4 и MASP-2 позволило авторам изобретения определить новый специфический для лектинового пути, но зависимый от MASP-2, путь активации компонента комплемента C3 в обход C4. Важный вклад этого нового опосредованного лектиновым путем пути активации в обход C4 в пост-ишемическую потерю ткани подчеркивается выдающимся защитным фенотипом с дефицитом MASP-2 при MIRI, в то время как у мышей с дефицитом C4, протестированных в той же модели, защита отсутствовала.

В данном примере авторы изобретения описывают новый опосредованный лектиновым путем и зависимый от MASP-2 путь активации компонента C3 комплемента в обход C4. На физиологическую важность этого нового пути активации указывает защитный фенотип с дефицитом MASP-2 в экспериментальной модели ишемии/реперфузионного повреждения миокарда (MIRI), в которой животные с дефицитом C4 не были защищены.

Методы

У мышей с дефицитом MASP-2 отсутствуют выраженные аномалии

Мышей с дефицитом MASP-2 получали, как описано в примере 1. Как гетерозиготные (+/-), так и гомозиготные (-/-), мыши с дефицитом MASP-2 являются здоровыми и фертильными, и у них отсутствуют выраженные аномалии. Ожидаемая продолжительность жизни у них такая же, как у их однопометников ДТ (>18 месяцев). Перед изучением фенотипа этих мышей в экспериментальных моделях заболевания мышей полученной авторами изобретения линии MASP-2-/- возвратно скрещивали в течение одиннадцати поколений на генетическом фоне C57BL/6. Полное отсутствие мРНК MASP-2 было подтверждено нозерн-блоттингом отобранных с поли A+ препаратов РНК из печени, при этом 1,2-т.п.н. мРНК, кодирующая MAp19 или sMAP (укороченный продукт альтернативного сплайсинга гена MASP2), экспрессируется в больших количествах.

Результаты кРВ-ПЦР анализа с использованием пар праймеров, специфических либо для кодирующей последовательности домена сериновой протеазы MASP-2 (B-цепи), либо оставшейся кодирующей последовательности для A-цепи, показали, что отсутствует поддающаяся обнаружению мРНК, кодирующая B-цепь, у мышей MASP-2-/-, в то же время относительное содержание транскрипта мРНК нарушенной A-цепи было значительно повышено. Аналогично, относительное содержание мРНК, кодирующей MAp19/sMAP, повышено у мышей MASP-2+/- и MASP-2-/-. Уровни в плазме MASP-2, определяемые методом ELISA для 5 животных каждого генотипа, составляли 300 нг/мл для контролей ДТ (диапазон 260-330 нг/мл), 360 нг/мл для гетерозиготных мышей (диапазон 330-395 нг/мл) и не поддавались определению у мышей MASP-2-/-. С использованием кРВ-ПЦР были получены профили экспрессии мРНК, показывающие, что

у мышей MASP-2-/- экспрессируется мРНК для MBL A, MBL C, фиколина A, MASP-1, MASP-3, C1q, C1rA, C1sA, фактора B, фактора D, C4 и C3 в относительных количествах, аналогичных тем, которые имеются у их однопометников с достаточным содержанием MASP-2 (данные не представлены).

Уровни в плазме C3 у однопометных мышей MASP-2-/- (n=8) и MASP-2+/+ (n=7) измеряли с использованием коммерчески доступного набора для анализа ELISA мышиного C3 (Kamiya, Biomedical, Seattle, WA). Уровни C3 у мышей с дефицитом MASP-2 (среднее 0,84 мг/мл, ± 0,34) были аналогичны таковым у контролей ДТ (среднее 0,92, ± 0,37).

Результаты

MASP-2 необходим для функциональной активности лектинового пути.

Как описано в примере 2 и показано на ФИГУРЕ 5, результаты in vitro анализа плазмы MASP-2-/- показали полное отсутствие функциональной активности лектинового пути на активирующих покрытых маннаном и зимозаном поверхностях для активации C4. Аналогично, не было обнаружено зависимое от лектинового пути расщепление C4 или C3 в плазме MASP-2-/- на поверхностях, покрытых N-ацетилглюкозамином, который связывает и запускает активацию через MBL A, MBL C и фиколин A (данные не представлены).

Анализ сыворотки и плазмы мышей MASP-2-/- четко продемонстрировал, что MASP-2 необходим для активации комплемента через лектиновый путь. Однако полное отсутствие функциональной активности лектинового пути не затрагивало другие пути активации комплемента: плазма MASP-2-/- все еще была способна активировать комплемент через классический (ФИГУРА 26A) и альтернативный путь (ФИГУРА 26B). На ФИГУРАХ 26A и 26B символом «*» обозначена сыворотка от ДТ (MASP-2 (+/+)); символом «□» обозначена сыворотка от ДТ (истощенная по C1q); символом «□» обозначена сыворотка от MASP-2 (-/-); и символом «Δ» обозначена сыворотка от MASP-2 (-/-) (истощенная по C1q).

На ФИГУРЕ 26A приведен график, показывающий, что у мышей MASP-2-/- сохраняется функциональный классический путь: отложение C3b анализировали на планшетах для микротитрования, покрытых иммунными комплексами (полученными in situ путем нанесения BSA, с последующим добавлением анти-BSA IgG козы). На ФИГУРЕ 26B приведен график, показывающий, что у мышей с дефицитом MASP-2 сохраняется функциональный альтернативный путь: отложение C3b анализировали на покрытых зимозаном планшетах для микротитрования в условиях, допускающих лишь альтернативный путь активации (буфер, содержащий Mg^{2+} и ЭГТА). Результаты, представленные на ФИГУРЕ 26A и ФИГУРЕ 26B, представляют собой средние значения для двух повторов и являются репрезентативными для трех независимых экспериментов. Всюду использованы одни и те же символы для источников плазмы. Эти результаты показывают, что функциональный альтернативный путь имеется у мышей с дефицитом MASP-2, о чем свидетельствуют результаты, представленные на ФИГУРЕ 26B в

экспериментальных условиях, разработанных для прямой инициации альтернативного пути, и при этом инактивации как классического пути, так и лектинового пути.

Лектиновый путь активации комплемента вносит важный вклад в воспалительную потерю ткани при ишемии/реперфузионном повреждении миокарда (MIRI).

Для изучения вклада функциональной активности лектинового пути в MIRI авторы изобретения сравнивали мышей MASP-2-/- и контрольных однопометников ДТ в модели MIRI после временной окклюзии и реперфузии левой передней нисходящей ветви коронарной артерии (LAD). Наличие или отсутствие C4 комплемента не оказывало никакого влияния на степень ишемической потери ткани при MIRI. Авторы изобретения оценивали влияние дефицита C4 на размеры очага омертвения после эксперимента с MIRI**.** Как показано на ФИГУРЕ 27A и ФИГУРЕ 27B, идентичные очаги омертвения имели место как у мышей с дефицитом C4, так и у их однопометников ДТ. На ФИГУРЕ 27A приведен график, показывающий индуцированную MIRI потерю ткани после окклюзии LAD и реперфузии у мышей C4-/- (n=6) и соответствующих контрольных однопометников ДТ (n=7). На ФИГУРЕ 27B приведен график, показывающий ИНФ в зависимости от ПРО, четко показывающий, что мыши C4-/- также подвержены MIRI, как и их контроли ДТ (пунктирная линия).

Эти результаты показывают, что мыши с дефицитом C4 не защищены от MIRI. Этот результат был неожиданным, поскольку он противоречит широко распространенному мнению, что основной фрагмент, образующийся в результате активации C4, C4b, является необходимым компонентом C3-конвертазы C4b2a классического и лектинового пути. Вследствие этого, авторы изобретения изучили, может ли быть обнаружена остаточная специфическая для лектинового пути активация C3 в плазме у мышей с дефицитом C4 и в человеческой плазме.

Лектиновый путь может активировать C3 комплемента в отсутствие C4 через новый зависимый от MASP-2 путь активации в обход C4

Воодушевленные ранними сообщениями, указывающими на существование пути активации в обход C4 в сыворотке морской свинки с дефицитом C4 (May, J.E., and M. Frank, J. Immunol. 111:1671-1677 (1973)), авторы изобретения проанализировали, может ли у мышей с дефицитом C4 сохраняться остаточная функциональная активность классического или лектинового пути, и провели мониторинг активации C3 в условиях, специфических для путей активации комплемента, исключающих вклад альтернативного пути.

Отложение C3b анализировали на покрытых маннаном планшетах для микротитрования с использованием рекальцинированной плазмы с концентрациями плазмы, исключающими альтернативный путь активации (1,25% и ниже). В то время как никакого расщепления C3 не было обнаружено в дефицитной по C4 плазме, тестированной на активацию классического пути (данные не представлены), сильную остаточную активность расщепления C3 наблюдали в плазме мышей с дефицитом C4 при

инициации активации комплемента через лектиновый путь. Зависимость от лектинового пути продемонстрирована на основании конкурентного ингибирования расщепления C3 после преинкубации дефицитной по C4 разбавленной плазмы с растворимым маннаном (смотри ФИГУРУ 28A). Как показано на ФИГУРАХ 28A-D, MASP-2-зависимая активация C3 имела место в отсутствие C4. На ФИГУРЕ 28A приведен график, показывающий отложение C3b с использованием C4+/+ (кресты) и C4-/- (незаштрихованные кружки) мышиной плазмы. Преинкубация C4-/- плазмы с избытком (1 мкг/мл) жидкофазного маннана перед проведением анализа приводила к полному ингибированию отложения C3 (заштрихованные кружки). Результаты являются репрезентативными для 3 независимых экспериментов. На ФИГУРЕ 28B приведен график, показывающий результаты эксперимента, в котором дикого типа, дефицитную по MASP-2 (незаштрихованные квадраты) и C4-/- мышиную плазму (1%) смешивали с мАт M11 против крысиного MASP-2 в различных концентрациях (абсцисса), и отложение C3b анализировали на покрытых маннаном планшетах. Результаты представляют собой средние значения (± SD) из 4 анализов (дубликаты из 2 для каждого типа плазмы). На ФИГУРЕ 28C приведен график, показывающий результаты эксперимента с использованием человеческой плазмы: объединенной НЧС (кресты), плазмы C4-/- (незаштрихованные кружки) и плазмы C4-/- (заштрихованные кружки), преинкубированной с 1 мкг/мл раствором маннана. Результаты являются репрезентативными для трех независимых экспериментов. На ФИГУРЕ 28D приведен график, показывающий ингибирование отложения C3b в содержащей достаточное количество C4 и дефицитной по C4 человеческой плазме (1%) мАт H3 против человеческого MASP-2 (средние значения ± SD из трех повторов). Как показано на ФИГУРЕ 28B, в плазме MASP-2-/-, проанализированной параллельно, отсутствовала зависимая от лектинового пути активация C3, это указывает на то, что данный путь активации C3 в обход C4 является MASP-2-зависимым.

Для дополнительного подтверждения данных результатов авторы изобретения создали серию рекомбинантных ингибирующих мАт, выделенных из фагово-дисплейных библиотек антител путем скрининга на аффинное связывание с рекомбинантным человеческим и крысиным MASP-2A (в котором остаток серина в активном домене протеазы был заменен остатком аланина методом сайт-направленного мутагенеза для предотвращения аутолитического расщепления антигена). Рекомбинантные антитела против MASP-2 (Ат H3 и Ат M11) были выделены из комбинаторных библиотек антител (Knappik, A., et al., J. Mol. Biol. 296:57-86 (2000)) с использованием рекомбинантного человеческого и крысиного MASP-2A в качестве антигенов (Chen, C.B. and Wallis, J. Biol. Chem. 276:25894-25902 (2001)). Fab2 фрагмент против крысиного белка, который сильно ингибировал опосредованную лектиновым путем активацию C4 и C3 в плазме мышей (IC_{50} ~1 нМ) был преобразован в полноразмерное IgG2a антитело. Поликлональная иммунная сыворотка против мышиного MASP-2A была получена у крыс. Эти инструменты позволили авторам изобретения подтвердить зависимость от MASP-2 данного нового, специфического для лектинового пути, пути активации C3 в обход C4,

как дополнительно описано ниже.

Как показано на ФИГУРЕ 28B, M211, ингибирующее моноклональное антитело, которое избирательно связывает мышиный и крысиный MASP-2, ингибировало активацию C3 в обход C4 у мышей с дефицитом C4, а также активацию C3 в плазме мышей ДТ через лектиновый путь зависимым от концентрации образом со сходными значениями IC_{50}. Все анализы выполняли при высоком разведении плазмы, что делает альтернативный путь активации не функциональным (максимальная концентрация плазмы составляла 1,25%).

Для выяснения наличия аналогичной специфичной для лектинового пути активации C3 в обход C4 у человека, авторы изобретения анализировали плазму донора с врожденным дефицитом обоих человеческих генов C4 (то есть, C4A и C4B), что приводит к полному отсутствию C4 (Yang, Y., et al., J. Immunol. 173:2803-2814 (2004)). На ФИГУРЕ 28C показано, что в плазме данного пациента происходит эффективная активация C3 при сильном разведении плазмы (что делает альтернативный путь активации не функциональным). Специфичный для лектинового пути характер активации C3 на покрытых маннаном планшетах продемонстрирован для мышиной дефицитной по C4 плазмы (ФИГУРА 28A) и человеческой дефицитной по C4 плазмы (ФИГУРА 28C) путем добавления жидкофазного маннана в избыточных концентрациях. Зависимость от MASP-2 этого механизма активации C3 в человеческой дефицитной по C4 плазме оценивали с использованием Ат H3, моноклонального антитела, которое специфически связывает человеческий MASP-2 и устраняет функциональную активность MASP-2. Как показано на ФИГУРЕ 28D, Ат H3 ингибировало отложение C3b (и C3dg) в человеческой плазме как с достаточным содержанием C4, так и с дефицитом C4, с сопоставимой эффективностью.

Для оценки возможной роли других компонентов комплемента в активации C3 в обход C4 авторы изобретения протестировали плазму мышей MASP-1/3-/- и Bf/C2-/- наряду с плазмой MASP-2-/-, C4-/- и C1q-/- (в качестве контролей) в условиях, как специфических как для лектинового пути, и так и специфических для классического пути. Строили график для количества расщепленного C3 относительно количества отложенного продукта C3 при использовании плазмы ДТ.

На ФИГУРЕ 29A приведен график, показывающий результаты сравнительного анализа активности C3-конвертазы в плазме различных линий мышей с дефицитом компонентов комплемента, протестированной в условиях анализа, специфических либо для лектинового пути активации, либо для классического пути активации. Разбавленные образцы плазмы (1%) мышей ДТ (n=6), мышей MASP-2-/- (n=4), мышей MASP-1/3-/- (n=2), мышей C4-/- (n=8), мышей C4/MASP-1/3-/- (n=8), мышей Bf/C2-/- (n=2) и мышей C1q-/- (n=2) тестировали параллельно. Добавление в плазму Bf/C2-/- 2,5 мкг/мл рекомбинантного крысиного C2 (Bf/C2-/- + C2) приводило к восстановлению отложения C3b. Результаты являются средними значениями (± SD), **$p<0,01$ (в сравнении с плазмой ДТ). Как показано на ФИГУРЕ 29A, значительное отложение C3 наблюдается в плазме C4-/-, протестированной в условиях, специфических для лектинового пути, но не в

условиях, специфических для классического пути. Опять-таки, отложение C3 отсутствовало в дефицитной по MASP-2 плазме в случае лектинового пути активации, при этом в той же плазме происходило отложение C3 через классический путь. В плазме MASP-1/3-/- отложение C3 происходило в условиях, специфических как для лектинового, так и для классического, пути. Не наблюдали отложение C3 в плазме с комбинированным дефицитом C4 и MASP-1/3, при использовании условий, специфических как для лектинового пути, так и для классического пути. Отсутствовало поддающееся обнаружению отложение C3 в плазме C2/Bf-/-, как в случае лектинового пути, так и в случае классического пути. Однако добавление в мышиную плазму C2/Bf-/- рекомбинантного C2 приводило к восстановлению опосредованного как лектиновым путем, так и классическим путем, расщепления C3. Условия анализа валидировали с использованием плазмы C1q-/-.

На ФИГУРЕ 29B приведен график, показывающий кинетику с временным разрешением активности C3-конвертазы в плазме от различных линий мышей с дефицитом компонентов комплемента, плазме ДТ, fB-/-, C4-/-, MASP-1/3-/- и MASP-2-/-, протестированной в условиях специфических для лектинового пути активации (1% плазма, результаты являются репрезентативными для трех независимых экспериментов). Как показано на ФИГУРЕ 29B, хотя расщепление C3 отсутствовало в плазме MASP-2-/-, в плазме fB-/- происходило расщепление C3 с кинетикой, аналогичной кинетике в плазме ДТ. Значительную отсрочку зависимого от лектинового пути превращения C3 в C3b (и C3dg) наблюдали в плазме C4-/-, а также в плазме, дефицитной по MASP-1/3. Эта отсрочка активации C3 в плазме MASP-1/3-/-, как недавно показано, является зависимой от MASP-1, а не от MASP-3 (Takahashi, M., et al., J. Immunol. 180:6132-6138 (2008)).

Обсуждение

Результаты, описанные в данном примере, убедительно свидетельствуют в пользу того, что функциональная активность MASP-2 чрезвычайно важна для активации C3 через лектиновый путь, как в присутствии, так и в отсутствие, C4. Кроме того, C2 и MASP-1 необходимы для функционирования этого нового, специфического для лектинового пути, пути активации C3 в обход C4. Сравнительный анализ функциональной активности лектинового пути в плазме MASP-2-/-, а также C4-/-, выявил наличие ранее неизвестного, независимого от C4, но зависимого от MASP-2, пути активации C3 комплемента и показал, что C3 может быть активирован зависимым от лектинового пути образом при полном отсутствии C4. Хотя подробный молекулярный состав и последовательность событий активации этого нового MASP-2-зависимого пути превращения C3 еще предстоит выяснить, результаты авторов изобретения позволяют предположить, что для данного пути активации в обход C4 также необходимо наличие C2 комплемента и MASP-1. Утрату опосредованной лектиновым путем активности расщепления C3 в плазме мышей с комбинированным дефицитом C4 и MASP-1/3 можно объяснить совсем недавно описанной ролью MASP-1 в усилении MASP-2-зависимой активации комплемента за счет прямого расщепления и активации MASP-2 (Takahashi, M., et al., J. Immunol. 180:6132-

6138 (2008)). Аналогично, MASP-1 может способствовать функциональной активности MASP-2 за счет его способности к расщеплению C2 (Moller-Kristensen, et al., Int. Immunol. 19:141-149 (2007)). Этими двумя активностями можно объяснить снижение скорости, с которой дефицитная по MASP-1/3 плазма расщепляет C3 через лектиновый путь активации, и причину, по которой MASP-1 может быть необходим для поддержания превращения C3 через путь активации в обход C4.

Неспособность плазмы C2/fB-/- к активации C3 через лектиновый путь, как показано, является C2-зависимой, поскольку добавление рекомбинантного крысиного C2 к плазме C2/fB-/- приводило к восстановлению способности восстановленной плазмы к активации C3 на покрытых маннаном планшетах.

Тот факт, что дефицит C4 приводит к специфическому нарушению классического пути активации комплемента, в то время как лектиновый путь сохраняет физиологически критический уровень активности C3-конвертазы через MASP-2-зависимый путь активации в обход C4, служит основанием для переоценки роли лектинового пути в различных моделях заболеваний, включая экспериментальное инфицирование S. pneumoniae (Brown, J. S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99:16969-16974 (2002); экспериментальный аллергический энцефаломиелит (Boos, L.A., et al., Glia 49:158-160 (2005); а также модели C3-зависимой регенерации мышиной печени (Clark, A., et al., Mol. Immunol. 45:3125-3132 (2008)). Авторы последней работы продемонстрировали, что у мышей с дефицитом C4 может происходить активация C3 независимым от альтернативного пути образом, поскольку in vivo ингибирование альтернативного пути за счет опосредованного антителом угнетения функциональной активности фактора B не влияло на зависимое от расщепления C3 восстановление печени у мышей C4-/- (Clark, A., et al. (2008)). Данная опосредованная лектиновым путем активация C3 в обход C4 может также объяснить отсутствие защитного фенотипа, связанного с дефицитом C4, в модели MIRI авторов изобретения, а также в ранее описанной модели отторжения аллотрансплантата почки (Lin, T., et al., Am. J. Pathol. 168:1241-1248 (2006)). Напротив, ранние результаты авторов изобретения независимо продемонстрировали в значительной степени защитный фенотип у мышей MASP-2-/- в моделях трансплантации почки (Farrar, C.A., et al., Mol. Immunol. 46:2832 (2009)).

Подводя итог, результаты, описанные в данном примере, свидетельствуют в пользу того, что MASP-2-зависимая активация C3 в обход C4 является физиологически значимым механизмом, который может быть важен в условиях, когда доступность C4 ограничивает активацию C3.

Пример 23

В данном примере описана активация C3 тромбиновыми субстратами и отложение C3 на маннане у мышей ДТ (+/+), MASP-2 (-/-), F11 (-/-), F11/C4 (-/-) и C4 (-/-).

Обоснование

Как описано в примере 14, было установлено, что активация тромбина может происходить после активации лектинового пути в физиологических условиях, и была

продемонстрирована степень вовлеченности MASP-2. C3 играет центральную роль в активации системы комплемента. Активация C3 необходима как для классического, так и для альтернативного, путей активации комплемента. Был проведен эксперимент для определения того, активируется ли C3 тромбиновыми субстратами.

Методы

Активация C3 тромбиновыми субстратами

Активацию C3 измеряли в присутствии следующих активированных форм тромбиновых субстратов; человеческого FCXIa, человеческого FVIIa, бычьего FXa, человеческого FXa, человеческого активированного белка C и человеческого тромбина. C3 инкубировали с разными тромбиновыми субстратами, затем разделяли в восстанавливающих условиях в 10% SDS-полиакриламидных гелях. После электрофоретического переноса на целлюлозную мембрану, мембрану инкубировали с моноклональным биотинилированным крысиным антителом против мышиного C3, с обнаружением при помощи набора с конъюгатом стрептавидин-HRP и развитием окраски за счет реагента ECL.

Результаты

Активация C3 включает расщепление интактной α-цепи на укороченную α'-цепь и растворимый C3a (не показано на ФИГУРЕ 30). На ФИГУРЕ 30 представлены результаты вестерн-блот анализа активации человеческого C3 тромбиновыми субстратами, при этом нерасщепленная альфа-цепь C3 и продукт активации α'-цепь указаны стрелками. Как показано на ФИГУРЕ 30, инкубация C3 с активированными формами человеческих факторов коагуляции XI и X, а также активированным бычьим фактором коагуляции X, может приводить к расщеплению C3 in vitro в отсутствие каких-либо протеаз комплемента.

Отложение C3 на маннане

Анализы отложения C3 проводили с образцами сыворотки, полученными от мышей ДТ, MASP-2 (-/-), F11(-/-), F11(-/-)/C4(-/-) и C4(-/-). F11 представляет собой ген, кодирующий фактор коагуляции XI. Для измерения активации C3 планшеты для микротитрования покрывали маннаном (1 мкг/лунку), затем добавляли овечью анти-HSA сыворотку (2 мкг/мл) в TBS/Tween/Ca^{2+}. Планшеты блокировали 0,1% HSA в TBS и промывали, как описано выше. Образцы плазмы разбавляли в 4 мМ растворе барбитала с 145 мМ NaCl, 2 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$, pH 7,4, добавляли в планшеты и инкубировали в течение 1,5 ч при 37°C. После промывания связанный C3b обнаруживали при помощи кроличьего антитела против человеческого C3c (Dako), с последующим использованием конъюгированного со щелочной фосфатазой антитела козы против IgG кролика и pNPP.

Результаты

На ФИГУРЕ 31 представлены результаты анализа отложения C3 с использованием образов сыворотки, полученных от мышей ДТ, MASP-2 (-/-), F11(-/-), F11(-/-)/C4 (-/-) и C4 (-/-). Как показано на ФИГУРЕ 31, функциональный лектиновый путь имеет место даже при полном отсутствии C4. Как также показано на ФИГУРЕ 31, для этой новой зависимой

от лектинового пути активации комплемента необходим фактор коагуляции XI.

Обсуждение

До получения результатов данного эксперимента специалисты в данной области считали, что для активности лектинового пути комплемента необходим C4. Вследствие этого, данные, полученные для мышей с нокаутом C4 (и для людей с дефицитом C4), были интерпретированы с предположением, что у таких организмов отсутствует лектиновый путь (помимо отсутствия классического пути). Настоящие результаты показывают, что это предположение не верно. Таким образом, выводы из прошлых исследований, предполагающие, что лектиновый путь не важен при некоторых заболеваниях, исходя из фенотипа животных с дефицитом C4, могут быть ложными. Данные, описанные в этом примере, также демонстрируют, что в физиологическом контексте цельной сыворотки лектиновый путь может активировать компоненты каскада коагуляции. Таким образом, показано, что имеет место взаимодействие между комплементом и коагуляцией с участием MASP-2.

Пример 24

В данном примере описаны способы оценки эффекта анти-MASP-2 антитела на лизис эритроцитов в образцах крови, полученных от пациентов с пароксизмальной ночной гемоглобинурией (PNH).

Предпосылки/обоснование

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), также называемая синдромом Маркиафавы-Микели, представляет собой приобретенное, потенциально угрожающее жизни заболевание крови, характеризующееся индуцированной комплементом внутрисосудистой гемолитической анемией. Характерной особенностью PNH является хронический внутрисосудистый гемолиз, который является последствием повышенной активации альтернативного пути комплемента. Lindorfer, M.A., et al., Blood 115(11) (2010). Анемия при PNH является следствием разрушения эритроцитов в кровотоке. Симптомы PNH включают красную мочу вследствие появления гемоглобина в моче и тромбоз. PNH может развиваться самостоятельно, ее называют «первичной PNH», или в контексте других заболеваний костного мозга, таких как апластическая анемия, ее называют «вторичной PNH». Лечение PNH включает переливание крови от анемии, использование антикоагулянтов от тромбоза и использование моноклонального антитела экулизумаба (солирис), которое защищает клетки крови от иммунного разрушения за счет ингибирования системы комплемента (Hillmen P. et al., N. Engl. J. Med. 350(6):552-9 (2004)). Однако у значительной части пациентов с PNH, получавших экулизумаб, сохраняется клинически значимая опосредованная иммунной системой гемолитическая анемия, поскольку антитело не блокирует активацию альтернативного пути комплемента.

В данном примере описаны способы оценки эффекта анти-MASP-2 антитела на лизис эритроцитов из образцов крови, полученных от пациентов с PNH (не получавших солирис), которые инкубируют с совпадающей по ABO подкисленной нормальной человеческой сывороткой.

Методы

Реагенты

Эритроциты от здоровых доноров и от пациентов, страдающих от PNH (не получавших солирис), получают путем прокола вены, и подготавливают, как описано в публикации Wilcox, L.A., et al., Blood 78:820-829 (1991), содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Анти-MASP-2 антитела с функцией блокирования активности лектинового пути могут быть получены, как описано в примере 10.

Анализ гемолиза:

Способ определения эффекта анти-MASP-2 антител на способность блокировать гемолиз эритроцитов пациентов с PNH осуществляют с использованием методов, описанных в публикациях Lindorfer, M.A., et al., Blood 15(11):2283-91 (2010) и Wilcox, L.A., et al., Blood 78:820-829 (1991), содержание обеих из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Как описано в публикации Lindorfer et al., эритроциты из образцов от пациентов с PNH центрифугируют, светлый слой кровяного сгустка удаляют аспирацией, и клетки промывают в желатин-вероналовом буфере (GVB) перед каждым экспериментом. Эритроциты тестируют на подверженность APC-опосредованному лизису следующим образом. Совпадающую по ABO нормальную человеческую сыворотку разбавляют GVB, содержащим 0,15 мМ $CaCl_2$ и 0,5 мМ $MgCl_2$ (GVB^{+2}), подкисляют до pH 6,4 (подкисленная НЧС, кНЧС) и используют для восстановления эритроцитов до гематокрита 1,6% в 50% кНЧС. Затем смеси инкубируют при 37°C, и через 1 час эритроциты осаждают центрифугированием. Оптическую плотность аликвоты восстановленного супернатанта измеряют при 405 нМ и используют для расчета лизиса, в процентах. Образцы, восстановленные в подкисленной сыворотке-ЭДТА, обрабатывают аналогично и используют для определения фонового не опосредованного комплементом лизиса (как правило, менее 3%). Полный лизис (100%) определяют после инкубации эритроцитов в дистиллированной воде.

Для определения эффекта анти-MASP-2 антител на гемолиз PNH эритроцитов, эритроциты от пациентов с PNH инкубируют в кНЧС в присутствии анти-MASP-2 антител в ступенчато возрастающих концентрациях, а затем количественно определяют наличие/степень гемолиза.

Ввиду того факта, что анти-MASP-2 антитела, как показано, блокируют последующую активацию альтернативного пути комплемента, ожидается, что анти-MASP-2 антитела будут эффективны для блокирования опосредованного альтернативным путем гемолиза PNH эритроцитов, и будут полезны в качестве терапевтического средства для лечения пациентов, страдающих от PNH.

Пример 25

В данном примере описаны способы оценки эффекта анти-MASP-2 блокирующего антитела на активацию комплемента криоглобулинами в образцах крови, полученных от пациентов, страдающих от криоглобулинемии.

Предпосылки/обоснование

Криоглобулинемия характеризуется наличием криоглобулинов в сыворотке. Криоглобулины представляют собой одиночные или смешанные иммуноглобулины (как правило, IgM антитела), которые претерпевают обратимую агрегацию при низких температурах. Агрегация приводит к активации классического пути комплемента и воспалению в сосудистом русле, в частности, на периферии. Клинические проявления криоглобулинемии включают васкулит и гломерулонефрит.

Криоглобулинемия может быть классифицирована следующим образом в зависимости от состава криоглобулинов: криоглобулинемия I типа, или простая криоглобулинемия, является результатом моноклонального иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина M (IgM); криоглобулинемия II и III типов (смешанная криоглобулинемия) включает ревматоидные факторы (RF), которые, как правило, представляют собой IgM в комплексах с Fc-областью поликлональных IgG.

Состояния, связанные с криоглобулинемией, включают инфекцию гепатита C, лимфопролиферативные заболевания и другие аутоиммунные заболевания. Криоглобулин-содержащие иммунные комплексы приводят к клиническому синдрому системного воспаления, возможно, вследствие их способности к активации комплемента. Хотя IgG иммунные комплексы обычно активируют классический путь комплемента, IgM-содержащие комплексы также могут активировать комплемент через лектиновый путь (Zhang, M., et al., Mol Immunol 44(1-3):103-110 (2007) и Zhang. M., et al., J. Immunol. 177(7):4727-34 (2006)).

Иммуногистохимические исследования дополнительно продемонстрировали, что криоглобулиновые иммунные комплексы содержат компоненты лектинового пути, и в биопсийных образцах от пациентов с криоглобулинемическим гломерулонефритом было обнаружено иммуногистохимическое доказательство активации лектинового пути in situ (Ohsawa, I., et al., Clin Immunol 101(1):59-66 (2001)). Эти результаты свидетельствуют о том, что лектиновый путь может вносить вклад в воспаление и неблагоприятные исходы при криоглобулинемических заболеваниях.

Методы

Способ определения эффекта анти-MASP-2 антител на возможность блокирования неблагоприятных эффектов криоглобулинемии осуществляют с использованием анализа на жидкофазное превращение C3, описанного в публикации Ng Y.C. et al., Arthritis and Rheumatism 31(1):99-107 (1988), содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Как описано в публикации Ng et al., при эссенциальной смешанной криоглобулинемии (EMC), моноклональный ревматоидный фактор (mRF), как правило IgM, образует комплекс с поликлональными IgG, с формированием криопреципитатных иммунных комплексов (IC) (криоглобулин II типа). Иммуноглобулины и C3 были обнаружены в стенках сосудов в пораженных тканях, таких как кожа, нервы и почки. Как описано в публикации Ng et al., ^{125}I-меченый mRF добавляют к сыворотке (нормальной человеческой сыворотке и сыворотке, полученной от пациентов, страдающих от

криоглобулинемии), инкубируют при 37°C и измеряют связывание с эритроцитами.

Жидкофазное превращение C3 определяют в сыворотке (нормальной человеческой сыворотке и сыворотке, полученной от пациентов, страдающих от криоглобулинемии) в присутствии или в отсутствие следующих IC: BSA-анти BSA, mRF, mRF плюс IgG или криоглобулины, в присутствии или в отсутствие анти-MASP-2 антител. Фиксацию C3 и C4 к IC измеряют с использованием анализа совместной преципитации с $F(ab')_2$ анти-C3 и $F(ab')_2$ анти-C4.

Ввиду того факта, что анти-MASP-2 антитела, как показано, блокируют активацию лектинового пути, ожидается, что анти-MASP-2 антитела будут эффективны в блокировании опосредованных комплементом неблагоприятных эффектов, связанных с криоглобулинемией, и будут полезны в качестве терапевтических средств для лечения пациентов, страдающих от криоглобулинемии.

Пример 26

В данном примере описаны способы оценки эффекта анти-MASP-2 антитела на образцы крови, полученные от пациентов, страдающих от болезни холодовых агглютининов, которая проявляется в виде анемии.

Предпосылки/обоснование

Болезнь холодовых агглютининов (CAD) является разновидностью аутоиммунной гемолитической анемии. Антитела холодовые агглютинины (как правило, IgM) активируются низкими температурами и связывают, а также агрегируют эритроциты. Антитела холодовые агглютинины в сочетании с комплементом атакуют антиген на поверхности эритроцитов. Это приводит к опсонизации эритроцитов (гемолиз), который инициирует их клиренс ретикулоэндотелиальной системой. Температура, при которой происходит агглютинация, отличается у разных пациентов.

CAD проявляется как анемия. Когда скорость разрушения эритроцитов превышает способность костного мозга вырабатывать достаточное количество клеток, переносящих кислород, развивается анемия. CAD может быть вызвана основным заболеванием или нарушением, ее называют «вторичной CAD», основным заболеванием может являться инфекционное заболевание (вызываемая микоплазмой пневмония, инфекционный паротит, мононуклеоз), лимфопролиферативное заболевание (лимфома, хронический лимфоцитарный лейкоз) или заболевание соединительной ткани. Считается, что пациенты с первичной CAD имеют слабовыраженное лимфопролиферативное заболевание костного мозга. Как первичная, так и вторичная, CAD являются приобретенными состояниями.

Методы

Реагенты

Эритроциты от здоровых доноров и от пациентов, страдающих от CAD, получают путем прокола вены. Анти-MASP-2 антитела с функцией блокирования активности лектинового пути могут быть получены, как описано в примере 10.

Способность анти-MASP-2 антител блокировать опосредованную холодовыми агглютининами активацию лектинового пути можно определять следующим образом.

Эритроциты пациентов с группой крови I сенсибилизируют холодовыми агглютининами (то есть, IgM антителами) в присутствии или в отсутствие анти-MASP-2 антител. Затем эритроциты тестируют на способность активировать лектиновый путь, измеряя связывание C3.

Ввиду того факта, что анти-MASP-2 антитела, как показано, блокируют активацию лектинового пути, ожидается, что анти-MASP-2 антитела будут эффективны в блокировании опосредованных комплементом неблагоприятных эффектов, связанных с болезнью холодовых агглютининов, и будут полезны в качестве терапевтических средств для лечения пациентов, страдающих от болезни холодовых агглютининов.

Пример 27

В данном примере описаны способы оценки эффекта анти-MASP-2 антитела на лизис эритроцитов в образцах крови, полученных от мышей с атипичным гемолитическим уремическим синдромом (aHUS).

Предпосылки/обоснование

Атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS) характеризуется наличием гемолитической анемии, тромбоцитопении и почечной недостаточности вследствие тромбоцитарных тромбов в микроваскулярной сети почки и других органов. aHUS связан с нарушенной регуляцией комплемента, и может быть или спорадическим, или семейным. Семейные случаи aHUS связаны с мутациями в генах, кодирующих белки, ответственные за активацию комплемента, включая фактор H комплемента, мембранный кофактор B и фактор I, а также связанный с фактором H комплемента белок 1 (CFHR1) и связанный с фактором H комплемента белок 3 (CFHR3). Zipfel, P.F., et al., PloS Genetics 3(3):e41 (2007). В данном примере описаны способы оценки эффекта анти-MASP-2 антитела на лизис эритроцитов из образцов крови, полученных от мышей с aHUS.

Методы

Способность анти-MASP-2 антител к лечению aHUS можно определять в модели данного заболевания на мышах, у которых эндогенный мышиный ген fH заменен человеческим гомологом, кодирующим мутантную форму fH, часто встречающуюся у пациентов с aHUS. Смотри публикацию Pickering M.C. et al., J. Exp. Med. 204(6):1249-1256 (2007), содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Как описано в публикации Pickering et al., у таких мышей развивается aHUS-подобная патология. Для оценки возможности использования анти-MASP-2 антитела для лечения aHUS, анти-MASP-2 антитела вводят мутантным мышам с aHUS и сравнивают лизис эритроцитов в образцах от получавших анти-MASP-2 Ат и не получавших Ат контролей. Ввиду того факта, что анти-MASP-2 антитела, как показано, блокируют активацию лектинового пути, ожидается анти-MASP-2 антитела будут эффективны в блокировании лизиса эритроцитов у субъектов-млекопитающих, страдающих от aHUS.

Пример 28

В данном примере описаны способы оценки эффекта анти-MASP-2 антитела в лечении глаукомы.

Обоснование/предпосылки

Показано, что неконтролируемая активация комплемента вносит вклад в прогрессирование дегенеративного повреждения ганглиозных клеток сетчатки (RGC), их синапсов и аксонов при глаукоме. Смотри Tezel G. et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 51:5071-5082 (2010). Например, гистопатологические исследования человеческих тканей и in vivo исследования с использованием разных животных моделей показали, что в глаукоматозной сетчатке синтезируются компоненты комплемента, включая C1q и C3, и образуется терминальный комплекс комплемента (смотри Stasi K. et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 47:1024-1029 (2006), Kuehn M.H. et al., Exp Eye Res 83:620-628 (2006)). Как также описано в публикации Kuehn M.H. et al., Experimental Eye Research 87:89-95 (2008), синтез и отложение компонентов комплемента индуцируется I/R сетчатки, и нарушение каскада комплемента приводит к отсрочке дегенерации RGC. В данном исследовании у мышей, у которых направленно разрушен компонент C3 комплемента, как показано, имеет место отсрочка дегенерации RGC после временной I/R сетчатки в сравнении с нормальными контрольными животными.

Методы

Способ определения эффекта анти-MASP-2 антитела на дегенерацию RGC осуществляют с использованием животной модели I/R сетчатки, описанной в публикации Kuehn M.H. et al., Experimental Eye Research 87:89-95 (2008), содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Как описано в публикации Kuehn et al., ишемию сетчатки индуцируют, после анестезии животного, путем введения иглы 30 калибра, соединенной с резервуаром, содержащим фосфатно-солевой буфер, через роговицу в переднюю камеру глаза. Затем резервуар с солевым раствором поднимают, повышая внутриглазное давление до 104 мм рт. ст., что достаточно для полного предотвращения циркуляции в сосудистой сети сетчатки. В наличии повышенной внутриглазной ишемии убеждаются на основании побледнения радужки и сетчатки, и ишемию поддерживают в течение 45 минут только в левом глазу; правый глаз служит в качестве контроля и остается без канюляции. Затем мышей умерщвляют через 1 или 3 недели после ишемического инсульта. Анти-MASP-2 антитела вводят мышам либо локально, в глаз, либо системно, для оценки эффекта анти-MASP антитела, введенного до ишемического инсульта.

Проводят иммуногистохимическое исследование глаз с использованием антител против C1q и C3 для обнаружения отложения компонентов комплемента. Повреждение зрительного нерва также можно оценивать стандартными методами электронной микроскопии. Количественное определение выживших RGC сетчатки проводят с использованием мечения гамма-синуклеином.

Результаты

Как описано в публикации Kuehn et al., у нормальных контрольных мышей временная ишемия сетчатки приводит к дегенеративным изменениям зрительного нерва и отложению в сетчатке C1q и C3, которое может быть обнаружено методами

иммуногистохимии. Напротив, у мышей с дефицитом C3 наблюдается заметное уменьшение дегенерации аксонов и лишь незначительные уровни повреждения зрительного нерва через 1 неделю после индукции. Исходя из данных результатов, ожидается, что аналогичные результаты имели бы место при проведении данного анализа на мышах с нокаутом MASP-2 и введении анти-MASP-2 антител нормальным мышам перед ишемическим инсультом.

Пример 29

Данный пример показывает, что ингибитор MASP-2, такой как анти-MASP-2 антитело, эффективен для лечения последствий облучения и/или для лечения, облегчения или предотвращения острого лучевого синдрома.

Обоснование

Воздействие высоких доз ионизирующего излучения вызывает гибель по двум механизмам: токсичность для костного мозга и желудочно-кишечный синдром. Токсичность для костного мозга приводит к падению числа всех клеток крови, предрасполагая организм к смерти в результате инфекции и кровотечения. Желудочно-кишечный синдром является более тяжелым состоянием и обусловлен потерей функции кишечного барьера из-за разрушения слоя кишечного эпителия и утраты эндокринной функции кишечника. Это приводит к сепсису и связанному синдрому системного воспалительного ответа, который может приводить к смерти.

Лектиновый путь комплемента является врожденным иммунным механизмом, который инициирует воспаление в ответ на повреждение ткани и воздействие инородных поверхностей (то есть, бактерий). Блокирование этого пути приводит к лучшим исходам в мышиных моделях ишемического повреждения ткани кишечника или септического шока. Предполагается, что лектиновый путь может вызывать избыточное и вредное воспаление в ответ на индуцированное облучением повреждение тканей. Блокирование лектинового пути может, таким образом, уменьшать вторичные повреждения и приводить к увеличению выживаемости после острого радиационного поражения.

Целью исследования, проводимого, как описано в данном примере, была оценка эффекта блокирования лектинового пути путем введения антител против мышиного MASP-2 на выживаемость в мышиной модели радиационного поражения.

Материалы и Методы

Материалы. Тестируемыми препаратами в данном исследовании были (i) высокоаффинное антитело против мышиного MASP-2 (мАт M11) и (ii) высокоаффинное антитело против человеческого MASP-2 (мАт H6), антитела, блокирующие белок MASP-2 - компонент лектинового пути комплемента, которые были продуцированы в трансфицированных клетках млекопитающих. Концентрации при дозировании составляли 1 мг/кг антитела против мышиного MASP-2 (мАт M11), 5 мг/кг антитела против человеческого MASP-2 (мАт H6), или стерильный солевой раствор. Для каждой сессии дозирования готовили соответствующий объем свежих растворов для дозирования.

Животные. Молодых взрослых самцов мышей Swiss-Webster получали от

компании Harlan Laboratories (Houston, TX). Животные были размещены в клетках с твердым дном, с подстилом Alpha-Dri, и получали сертифицированную диету для грызунов PMI 5002 (Animal Specialties, Inc., Hubbard OR) и воду без ограничения. Температуру в помещении для животных контролировали, и поддерживали световой режим 12 часов света/12 часов темноты.

Облучение. После 2-недельной акклиматизации в помещении мышей в группах по 10 облучали дозами 6,5 и 7,0 Гр путем облучения всего тела с интенсивностью дозы 0,78 Гр/мин, используя систему Therapax X-RAD 320, оснащенную высокостабильным рентгеновским 320-кВ генератором, металлокерамической рентгеновской трубкой, переменным коллиматором рентгеновских лучей и фильтром (Precision X-ray Incorporated, East Haven, CT). Уровни доз выбирали на основании предыдущих исследований, проводимых с мышами той же линии, результаты которых показали, что $LD_{50/30}$ составляет от 6,5 до 7,0 Гр (данные не представлены).

Формулирование и введение лекарственного средства. Соответствующие объемы концентрированных маточных растворов разбавляли ледяным солевым раствором, получая растворы для дозирования с концентрациями 0,2 мг/мл антитела против мышиного MASP-2 (мАт M11) или 0,5 мг/мл антитела против человеческого MASP-2 (мАт H6), в соответствии с протоколом. Введение анти-MASP-2 антител мАт M11 и мАт H6 производили путем в/б инъекции с использованием иглы 25 калибра для доставки, исходя из массы тела животного, 1 мг/кг мАт M11, 5 мг/кг мАт H6 или солевого раствора.

Дизайн исследования. Мышей случайным образом распределяли в группы, указанные в ТАБЛИЦЕ 8. Массу тела и температуру измеряли и регистрировали ежедневно. Мышей в группах 7, 11 и 13 умерщвляли в день 7 после облучения, и кровь собирали путем прокола сердца под глубокой анестезией. Выживших животных в день 30 после облучения умерщвляли таким же образом, и кровь собирали. Из собранных образцов крови получали плазму в соответствии с протоколом и возвращали Спонсору для анализа.

ТАБЛИЦА 8: ГРУППЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Группа	N	Уровень облучения (Гр)	Препарат	Схема дозирования
1	20	6,5	Растворитель	18 ч до облучения, 2 ч после облучения, еженедельный бустер
2	20	6,5	Ат против мышиного MASP-2 (мАт M11)	Только 18 ч до облучения
3	20	6,5	Ат против мышиного MASP-2	18 ч до облучения, 2 ч после облучения, еженедельный

			(мАт M11)	бустер
4	20	6,5	Ат против мышиного MASP-2 (мАт M11)	2 ч после облучения, еженедельный бустер
5	20	6,5	Ат против человеческого MASP-2 (мАт H6)	18 ч до облучения, 2 ч после облучения, еженедельный бустер
6	20	7,0	Растворитель	18 ч до облучения, 2 ч после облучения, еженедельный бустер
7	5	7,0	Растворитель	Только 2 ч после облучения
8	20	7,0	Ат против мышиного MASP-2 (мАт M11)	Только 18 ч до облучения
9	20	7,0	Ат против мышиного MASP-2 (мАт M11)	18 ч до облучения, 2 ч после облучения, еженедельный бустер
10	20	7,0	Ат против мышиного MASP-2 (мАт M11)	2 ч после облучения, еженедельный бустер
11	5	7,0	Ат против мышиного MASP-2 (мАт M11)	Только 2 ч после облучения
12	20	7,0	Ат против человеческого MASP-2 (мАт H6)	18 ч до облучения, 2 ч после облучения, еженедельный бустер
13	5	Нет	Нет	Нет

Статистический анализ. Строили кривые выживаемости Каплана-Мейера и использовали для сравнения среднего времени выживания в разных группах лечения с использованием логарифмического рангового критерия и критерия Вилкоксона. Представлены средние значения со стандартным отклонением, или средние значения со стандартной ошибкой среднего. Статистические сравнения проводили между контрольными облученными животными и отдельными группами лечения с

использованием двустороннего непарного критерия Стьюдента.

Результаты

Графики выживаемости Каплана-Мейера для групп животных, облученных 7,0 и 6,5 Гр, представлены на ФИГУРАХ 32A и 32B, соответственно, и данные суммированы ниже в ТАБЛИЦЕ 9. В целом, введение Ат против мышиного MASP-2 (мАт M11) перед облучением приводило к увеличению выживаемости облученных мышей в сравнении с получавшими растворитель облученными контрольными животными при использовании обоих уровней облучения 6,5 (увеличение 20%) и 7,0 Гр (увеличение 30%). При уровне облучения 6,5 Гр введение после облучения Ат против мышиного MASP-2 приводило к умеренному увеличению выживаемости (15%) в сравнении с получавшими растворитель контрольными облученными животными.

При сравнении все получавшие препарат животные в группе с уровнем облучения 7,0 Гр демонстрировали повышенную выживаемость в сравнении с получавшими растворитель облученными контрольными животными. Наибольшее изменение выживаемости имело место у животных, получавших мАт H6, с увеличением на 45% в сравнении с контрольными животными. Кроме того, в группе с уровнем облучения 7,0 Гр случаи смерти в группе, получавшей мАт H6, впервые наблюдали в день 15 после облучения, в сравнении с днем 8 после облучения в группе получавших растворитель облученных контрольных животных; срок выживания был увеличен на 7 дней относительно контрольных животных. Среднее время до смерти у мышей, получавших мАт H6 (27,3 ± 1,3 дней) было значительно увеличено (p=0,0087) в сравнении с контрольными животными (20,7 ± 2,0 дней) в группе с уровнем облучения 7,0 Гр.

Процентное изменение массы тела в сравнении с днем перед облучением (день -1) регистрировали на протяжении всего исследования. Временное снижение массы тела имело место у всех облученных животных, без признаков отличающихся изменений в результате лечения мАт M11 или мАт H6 в сравнении с контролем (данные не представлены). После завершения исследования у всех выживших животных наблюдали увеличение массы тела от исходной массы тела (день -1).

ТАБЛИЦА 9: СТЕПЕНЬ ВЫЖИВАЕМОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ, ПОДВЕРГНУТЫХ ОБЛУЧЕНИЮ

Группа исследования	Уровень облучения	Выживаемость (%)	Время до смерти (среднее ± SEM, дни)	Первая/последняя смерть (дни)
Контрольное облучение	6,5 Гр	65%	24,0 ± 2,0	9/16
мАт M11 до облучения	6,5 Гр	85%	27,7 ± 1,5	13/17

мАт M11 до+после облучения	6,5 Гр	65%	24,0 ± 2,0	9/15
мАт M11 после облучения	6,5 Гр	80%	26,3 ± 1,9	9/13
мАт H6 до+после облучения	6,5 Гр	65%	24,6 ± 1,9	9/19
Контрольное облучение	7,0 Гр	35%	20,7 ± 2,0	8/17
мАт M11 до облучения	7,0 Гр	65%	23,0 ± 2,3	7/13
мАт M11 до+после облучения	7,0 Гр	55%	21,6 ± 2,2	7/16
мАт M11 после облучения	7,0 Гр	70%	24,3 ± 2,1	9/14
мАт H6 до+после облучения	7,0 Гр	80%	27,3 ± 1,3*	15/20

*p=0,0087 при использовании двустороннего непарного критерия Стьюдента для сравнения контрольных облученных животных и получавших лечение животных при одном и том же уровне облучения.

Обсуждение

Острый лучевой синдром состоит из трех четких подсиндромов: гемопоэтического, желудочно-кишечного и цереброваскулярного. Наблюдаемый синдром зависит от дозы облучения, при этом гемопоэтические эффекты наблюдаются у человека при уровнях облучения значительной части, или всего, тела, превышающих 1 Гр. Гемопоэтический синдром характеризуется тяжелым подавлением функции костного мозга, приводящим к панцитопении с изменением количества клеток крови, эритроцитов и лейкоцитов, а также тромбоцитов, параллельно с повреждением иммунной системы. В период крайнего упадка с небольшим количеством нейтрофилов и тромбоцитов в периферической крови, нейтропения, лихорадка, осложнения сепсиса и неконтролируемое кровотечение приводят к смерти.

В настоящем исследовании было обнаружено, что введение мАт H6 приводит к увеличению выживаемости при рентгеновском облучении всего тела у самцов мышей линии Swiss-Webster при уровне облучения 7,0 Гр. Примечательно, что при уровне

облучения 7,0 Гр 80% животных, получавших мАт H6, выживали в течение 30 дней, в сравнении с 35% получавших растворитель контрольных облученных животных. Важно отметить, что первый случай смерти в этой группе лечения не происходил до дня 15 после облучения, это составляет 7-дневное увеличение относительно того, что имело место у получавших растворитель контрольных облученных животных. Интересно, что при более низкой дозе рентгеновского облучения (6,5 Гр) введение мАт H6, судя по всему, не влияло на срок выживания или отсрочку смерти в сравнении с получавшими растворитель контрольными облученными животными. Может быть несколько причин для этой разницы в реакции между уровнями облучения, хотя проверка любой гипотезы может потребовать дополнительных исследований, в том числе промежуточного сбора образцов для микробиологического культивирования и оценки гематологических параметров. Одно из объяснений может заключаться просто в том, что из-за количества животных, отнесенных к группам, можно было не увидеть какие-либо тонкие различия, связанные с лечением. Например, при размере групп n=20, разница в выживаемости между 65% (мАт H6 при уровне облучения 6,5 Гр) и 80% (мАт H6 при уровне облучения 7,0 Гр) составляет 3 животных. С другой стороны, разница между 35% (контроль с растворителем при уровне облучения 7,0 Гр) и 80% (мАт H6 при уровне облучения 7,0 Гр) составляет 9 животных, и предоставляет убедительные доказательства различий, связанных с лечением.

Полученные результаты показывают, что анти-MASP-2 антитела являются эффективными в лечении субъекта-млекопитающего, имеющего риск развития, или страдающего от, разрушительного действия острого лучевого синдрома.

Пример 30

В данном примере показано, что мыши с дефицитом MASP-2 защищены от вызываемой Neisseria meningitidis гибели после инфицирования либо N. meningitidis серогруппы A, либо Neisseria meningitidis серогруппы B.

Методы

Мышей с нокаутом MASP-2 (мыши MASP-2 KO) получали, как описано в примере 1. 10-недельным мышам MASP-2 KO (n=10) и мышам C57/BL6 дикого типа (ДТ) (n=10) вводили внутрибрюшинной (в/б) инъекцией дозу 2,6×107 КОЕ Neisseria meningitidis серогруппы A Z2491 в объеме 100 мкл. Инфекционную дозу вводили мышам в сочетании с комплексом железо-декстран в конечной концентрации 400 мг/кг. Выживаемость мышей после инфицирования контролировали в течение 72-часового периода времени.

В отдельном эксперименте 10-недельным мышам MASP-2 KO (n=10) и мышам C57/BL6 дикого типа (n=10) вводили в/б инъекцией дозу 6×106 КОЕ Neisseria meningitidis серогруппы B штамма MC58 в объеме 100 мкл. Инфекционную дозу вводили мышам в сочетании с комплексом железо-декстран в конечной дозе 400 мг/кг. Выживаемость мышей после инфицирования контролировали в течение 72-часового периода времени. Балльный показатель нездоровья также определяли для мышей ДТ и MASP-2 KO в течение 72-часового периода времени после инфицирования, на основании балльных

параметров нездоровья, приведенных ниже в ТАБЛИЦЕ 10, которая основана на схеме, описанной в публикации Fransen et al. (2010), с небольшими модификациями.

ТАБЛИЦА 10: БАЛЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ НЕЗДОРОВЬЯ, СВЯЗАННЫЕ С КЛИНИЧЕСКИМИ ПРИЗНАКАМИ У ИНФИЦИРОВАННЫХ МЫШЕЙ

Признаки	Баллы
Норма	0
Слегка взъерошенный мех	1
Взъерошенный мех, медленно движущиеся и слипающиеся глаза	2
Взъерошенный мех, вялость, закрытые глаза	3
Очень тяжелое состояние, нет реакции на стимуляцию	4
Смерть	5

Образцы крови собирали у мышей с часовыми интервалами после инфицирования и анализировали для определения уровня в сыворотке (log КОЕ/мл) N. meningitidis с целью подтверждения инфицирования и определения скорости клиренса бактерий из сыворотки.

Результаты

На ФИГУРЕ 33 представлен график Каплана-Мейера, показывающий выживаемость, в процентах, мышей MASP-2 KO и ДТ после введения инфекционной дозы 2,6×107 КОЕ N. meningitidis серогруппы A Z2491. Как показано на ФИГУРЕ 33, 100% мышей MASP-2 KO выживали в течение всего 72-часового периода после инфицирования. Напротив, лишь 80% мышей ДТ (p=0,012) были все еще живы через 24 часа после инфицирования, и лишь 50% мышей ДТ были все еще живы через 72 часа после инфицирования. Эти результаты показывают, что мыши с дефицитом MASP-2 защищены от гибели, вызываемой N. meningitidis серогруппы A Z2491.

На ФИГУРЕ 34 представлен график Каплана-Мейера, показывающий выживаемость, в процентах, мышей MASP-2 KO и ДТ после введения инфекционной дозы 6×106 КОЕ N. meningitidis серогруппы B штамма MC58. Как показано на ФИГУРЕ 34, 90% мышей MASP-2 KO выживали в течение всего 72-часового периода после инфицирования. Напротив, лишь 20% мышей ДТ (p=0,0022) были все еще живы через 24 часа после инфицирования. Эти результаты показывают, что мыши с дефицитом MASP-2 защищены от гибели, вызываемой N. meningitidis серогруппы B штамма MC58.

На ФИГУРЕ 35 приведен график, показывающий log КОЕ/мл N. meningitidis серогруппы B штамма MC58, извлеченных в разные моменты времени из образцов крови, полученных от мышей MASP-2 KO и ДТ после в/б инфицирования 6×10^6 КОЕ N. meningitidis серогруппы B штамма MC58 (n=3 в разные моменты времени для обеих групп мышей). Результаты представлены в виде средних значений ± SEM. Как показано на ФИГУРЕ 35, у мышей ДТ уровень N. meningitidis в крови достигал пикового значения примерно 6,0 log КОЕ/мл через 24 часа после инфицирования и падал до примерно 4,0 log КОЕ/мл через 36 часов после инфицирования. Напротив, у мышей MASP-2 KO уровень N. meningitidis достигал пикового значения примерно 4,0 log КОЕ/мл через 12 часов после

инфицирования и падал до примерно 1,0 log КОЕ/мл через 36 часов после инфицирования (символ «*» соответствует $p<0,05$; символ «**» соответствует $p=0,0043$). Эти результаты показывают, что, хотя мыши MASP-2 KO были инфицированы такой же дозой N. meningitidis серогруппы B штамма MC58, что и мыши ДТ, у мышей MASP-2 KO наблюдался повышенный клиренс бактерий из крови в сравнении с ДТ.

На ФИГУРЕ 36 приведен график, показывающий средний балльный показатель нездоровья для мышей MASP-2 KO и ДТ через 3, 6, 12 и 24 часа после инфицирования 6×10^6 КОЕ N. meningitidis серогруппы B штамма MC58. Как показано на ФИГУРЕ 36, мыши с дефицитом MASP-2 имели высокую устойчивость к инфекции, с гораздо более низкими показателями нездоровья через 6 часов (символ «*» соответствует $p=0,0411$), 12 часов (символ «**» соответствует $p=0,0049$) и 24 часа (символ «***» соответствует $p=0,0049$) после инфицирования, в сравнении с мышами ДТ. Результаты на ФИГУРЕ 36 представлены в виде средних значений ± SEM.

Подводя итог, результаты в данном примере показывают, что мыши с дефицитом MASP-2 защищены от вызываемой Neisseria meningitides гибели после инфицирования либо N. meningitidis серогруппы A, либо N. meningitidis серогруппы B.

Пример 31

В данном примере показано, что введение анти-MASP-2 антитела после инфицирования N. meningitidis приводит к увеличению выживаемости мышей, инфицированных N. meningitidis.

Предпосылки/обоснование

Как описано в примере 10, крысиный белок MASP-2 был использован для сортировки фагово-дисплейной библиотеки Fab, из которой идентифицировали Fab2 № 11 в качестве функционально активного антитела. Из Fab2 № 11 были получены полноразмерные антитела крысы изотипа IgG2c и мыши изотипа IgG2a. Полноразмерное мышиное анти-MASP-2 антитело изотипа IgG2a было охарактеризовано в отношении фармакодинамических параметров (как описано в примере 19).

В данном примере полноразмерное мышиное анти-MASP-2 антитело, полученное из Fab2 № 11, было проанализировано в мышиной модели инфекции, вызываемой N. meningitidis.

Методы

Мышиное полноразмерное анти-MASP-2 антитело изотипа IgG2a, полученное из Fab2 №11, полученного, как описано выше, тестировали в мышиной модели инфекции, вызываемой N. meningitidis, следующим образом.

Введение мышиных анти-*MASP-*2 моноклональных антител (моАт) после инфицирования

Мышам C57/BL6 (Charles River) в возрасте 9 недель вводили ингибирующее мышиное анти-MASP-2 антитело (1,0 мг/кг) (n=12) или контрольное по изотипу антитело (n=10) через 3 часа после в/б инъекции высокой дозы (4×10^6 КОЕ) N. meningitidis серогруппы B штамма MC58.

Результаты

На ФИГУРЕ 37 представлен график Каплана-Мейера, показывающий выживаемость, в процентах, мышей после введения инфекционной дозы 4×10^6 КОЕ N. meningitidis серогруппы B штамма MC58, с последующим введением через 3 часа после инфицирования либо ингибирующего анти-MASP-2 антитела (1,0 мг/кг), либо контрольного по изотипу антитела. Как показано на ФИГУРЕ 37, 90% мышей, получавших анти-MASP-2 антитело, выживали в течение всего 72-часового периода после инфицирования. Напротив, лишь 50% мышей, получавших контрольное по изотипу антитело, выживали в течение всего 72-часового периода после инфицирования. Символ «*» соответствует p=0,0301, при определении путем сравнения двух кривых выживаемости.

Эти результаты показывают, что введение анти-MASP-2 антитела эффективно для лечения и увеличения выживаемости у субъектов, инфицированных N. meningitidis.

Как продемонстрировано в настоящем документе, использование анти-MASP-2 антитела в лечении субъекта, инфицированного N. meningitidis, является эффективным при введении в пределах 3 часов после инфицирования, и, как ожидается, будет эффективным в пределах от 24 до 48 часов после инфицирования. Менингококковое заболевание (или менингококкемия, или менингит) является заболеванием, требующим неотложной медицинской помощи, и терапию, как правило, начинают немедленно при подозрении на менингококковую инфекцию (то есть, до того, как N. meningitidis будет положительно идентифицирована в качестве этиологического возбудителя).

Ввиду результатов, полученных для мышей MASP-2 KO, которые описаны в примере 30, считается, что введение анти-MASP-2 антитела до инфицирования N. meningitidis также являлось бы эффективным для предотвращения или ослабления тяжести инфекции.

Пример 32

В данном примере показано, что введение анти-MASP-2 антитела эффективно для лечения инфекции, вызываемой N. meningitidis, в человеческой сыворотке.

Обоснование

Пациенты с пониженными сывороточными уровнями функционального MBL имеют повышенную предрасположенность к рецидивирующим бактериальным и грибковым инфекциям (Kilpatrick et al., Biochim Biophys Acta 1572:401-413 (2002)). Известно, что N. meningitidis узнается MBL, и было показано, что дефицитная по MBL сыворотка не лизирует Neisseria.

Ввиду результатов, описанных в примерах 30 и 31, проводили серию экспериментов для определения эффективности введения анти-MASP-2 антитела для лечения инфекции, вызываемой N. meningitidis, в дефицитной по компонентам комплемента и контрольной человеческой сыворотке. Эксперименты проводили при высокой концентрации сыворотки (20%) для сохранения пути комплемента.

Методы

1. Сывороточная бактерицидная активность в различных дефицитных по компонентам комплемента человеческих сыворотках и в человеческой сыворотке с добавленным человеческим анти-MASP-2 антителом

В данном эксперименте использовали следующие дефицитные по компонентам комплемента человеческие сыворотки и контрольные человеческие сыворотки.

ТАБЛИЦА 11: ПРОТЕСТИРОВАННЫЕ ОБРАЗЦЫ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ (КАК ПОКАЗАНО НА ФИГУРЕ 38)

Образец	**Тип сыворотки**
A	Нормальная человеческая сыворотка (НЧС) + человеческое анти-MASP-2 Ат
B	НЧС+контрольное по изотипу Ат
C	Человеческая сыворотка MBL -/-
D	НЧС
E	Инактивированная нагреванием (ИН) НЧС

Рекомбинантное антитело против человеческого MASP-2 было выделено из комбинаторной библиотеки антител (Knappik, A., et al., J. Mol. Biol. 296:57-86 (2000)), с использованием рекомбинантного человеческого MASP-2A в качестве антигена (Chen, C.B. and Wallis, J. Biol. Chem. 276:25894-25902 (2001)). Был идентифицирован фрагмент scFv против человеческого антигена, эффективно ингибировавший опосредуемую лектиновым путем активацию C4 и C3 в человеческой плазме (IC_{50} ~20 нМ), и преобразован в полноразмерное человеческое IgG4 антитело.

N. meningitidis серогруппы B-MC58 инкубировали с разными сыворотками, приведенными в ТАБЛИЦЕ 11, каждая из них в концентрации 20%, с добавлением, или без добавления, ингибирующего человеческого анти-MASP-2 антитела (3 мкг в общем объеме 100 мкл) при 37°C со встряхиванием. Образцы отбирали в следующих временных точках: через 0, 30, 60 и 90 минут, высевали на чашки, а затем подсчитывали количество жизнеспособных клеток. Инактивированная нагреванием человеческая сыворотка служила отрицательным контролем.

Результаты

На ФИГУРЕ 38 приведен график, показывающий log КОЕ/мл количества жизнеспособных клеток N. meningitidis серогруппы B-MC58, извлеченных в разные моменты времени из образцов человеческих сывороток, приведенных в ТАБЛИЦЕ 11. В ТАБЛИЦЕ 12 приведены результаты применения критерия Стьюдента к данным на ФИГУРЕ 38.

ТАБЛИЦА 12: РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ КРИТЕРИЯ СТЬЮДЕНТА К ДАННЫМ НА ФИГУРЕ 38 (ВРЕМЕННАЯ ТОЧКА 60 МИНУТ)

	Средняя разница (Log)	**Значимо? P<0,05?**	**Сводные P-значения**

A против B	-0,3678	Да	***(0,0002)
A против C	-1,1053	Да	***(p<0,0001)
A против D	-0,2111	Да	**(0,0012)
C против D	1,9	Да	***(p<0,0001)

Как показано на ФИГУРЕ 38 и ТАБЛИЦЕ 12, зависимое от комплемента уничтожение N. meningitidis в человеческой 20% сыворотке было значительно повышено при добавлении человеческого анти-MASP-2 ингибирующего антитела.

***2. Зависимое от комплемента уничтожение* N. meningitidis *в 20% (об/об) мышиных сыворотках, дефицитных по* MASP-2.**

В данном эксперименте использовали следующие дефицитные по компонентам комплемента мышиные сыворотки и контрольные мышиные сыворотки.

ТАБЛИЦА 13: ПРОТЕСТИРОВАННЫЕ ОБРАЗЦЫ МЫШИНЫХ СЫВОРОТОК (КАК ПОКАЗАНО НА ФИГУРЕ 39)

Образец	Тип сыворотки
A	ДТ
B	MASP-2-/-
C	MBL A/C-/-
D	ДТ, инактивированная нагреванием (ИН)

N. meningitidis серогруппы B-MC58 инкубировали с разными дефицитными по компонентам комплемента мышиными сыворотками, каждая из них в концентрации 20%, при 37°C со встряхиванием. Образцы отбирали в следующих временных точках: через 0, 15, 30, 60, 90 и 120 минут, высевали на чашки, а затем подсчитывали количество жизнеспособных клеток. Инактивированная нагреванием человеческая сыворотка служила отрицательным контролем.

Результаты

На ФИГУРЕ 39 приведен график, показывающий log КОЕ/мл количества жизнеспособных клеток N. meningitidis серогруппы B-MC58, извлеченных в разные моменты времени из образцов мышиных сывороток, приведенных в ТАБЛИЦЕ 13**.** Как показано на ФИГУРЕ 39, мышиная сыворотка MASP-2-/- имеет более высокий уровень бактерицидной активности в отношении N. meningitidis, чем мышиная сыворотка ДТ. Символ «**» соответствует p=0,0058, символ «***» соответствует p=0,001. В ТАБЛИЦЕ 14 приведены результаты применения критерия Стьюдента к данным на ФИГУРЕ 39.

ТАБЛИЦА 14: РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ КРИТЕРИЯ СТЬЮДЕНТА К ДАННЫМ НА ФИГУРЕ 39

Сравнение	Временная точка	Средняя разница (LOG)	Значимо? (p<0,05)?	Сводные P-значения
A против B	60 мин	0,39	да	** (0,0058)
A против B	90 мин	0,6741	да	*** (0,001)

Подводя итог, результаты в данном примере показывают, что сыворотка MASP-2-/- имеет более высокий уровень бактерицидной активности в отношении N. meningitidis, чем сыворотка ДТ.

Пример 33

В данном примере продемонстрирован ингибирующий эффект дефицита MASP-2 на лизис эритроцитов из образцов крови, полученных в мышиной модели пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH).

Предпосылки/обоснование

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), также называемая синдромом Маркиафавы-Микели, представляет собой приобретенное, потенциально угрожающее жизни заболевание крови, характеризующееся индуцированной комплементом внутрисосудистой гемолитической анемией. Характерной особенностью PNH является хронический внутрисосудистый гемолиз, который является последствием повышенной активации альтернативного пути комплемента из-за отсутствия регуляторов комплемента CD55 и CD59 на эритроцитах PNH, с последующей гемоглобинурией и анемией. Lindorfer, M.A., et al., Blood 115(11) (2010), Risitano, A.M, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 11:528-535 (2011). Анемия при PNH является следствием разрушения эритроцитов в кровотоке. Симптомы PNH включают красную мочу из-за появления гемоглобина в моче, боль в спине, утомляемость, одышку и тромбоз. PNH может развиваться самостоятельно, ее называют «первичной PNH», или в контексте других заболеваний костного мозга, таких как апластическая анемия, ее называют «вторичной PNH». Лечение PNH включает переливание крови от анемии, использование антикоагулянтов от тромбоза и использование моноклонального антитела экулизумаба (солирис), которое защищает клетки крови от иммунного разрушения за счет ингибирования системы комплемента (Hillmen P. et al., N. Engl. J. Med. 350(6):552-9 (2004)). Экулизумаб (солирис®) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, направленное на компонент C5 комплемента, которое блокирует его расщепление C5-конвертазами, тем самым предотвращая образование C5a и сборку MAC. Лечение пациентов с PNH экулизумабом приводит к уменьшению внутрисосудистого гемолиза, что измеряют по уровню лактатдегидрогеназы (LDH), приводит к стабилизации уровня гемоглобина и устранению потребности в переливании крови у примерно половины пациентов (Hillmen P, et al., Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, vol 11(6) (2011)). Хотя у почти всех пациентов, получающих лечение экулизумабом, восстанавливаются нормальные или почти нормальные уровни LDH (вследствие контроля внутрисосудистого гемолиза), лишь примерно у одной трети пациентов показатель гемоглобина достигает уровня выше 11 гр/дл, а у остальных пациентов, получающих экулизумаб, сохраняется анемия средней или тяжелой степени (то есть, зависимость от переливания крови) в примерно равной пропорции (Risitano A.M. et al., Blood 113:4094-100 (2009)). Как описано в публикации Risitano et al., Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 11:528-535 (2011), было показано, что пациенты с PNH, получающие экулизумаб, имеют фрагменты C3, связанные со

значительной частью их PNH эритроцитов (в отличие от пациентов, не получающих препарат), это позволяет сделать вывод, что связанные с мембраной фрагменты C3 действуют в качестве опсонинов на PNH эритроцитах, приводя к их захвату в ретикулоэндотелиальные клетки через специфические рецепторы C3 и последующему внесосудистому гемолизу. Таким образом, необходимы дополнительные стратегии лечения, помимо использования экулизумаба, для таких пациентов, у которых имеет место опосредованный фрагментами C3 внесосудистый гемолиз, поскольку они продолжают нуждаться в переливании эритроцитов.

В данном примере описаны способы оценки эффекта дефицитной по MASP-2-сыворотки и сыворотки, обработанной ингибирующим MASP-2 средством, на лизис эритроцитов из образцов крови, полученных в мышиной модели PNH, и показана эффективность ингибирования MASP-2 в лечении субъектов, страдающих от PNH, а также приведены свидетельства в пользу использования ингибиторов MASP-2 для ослабления эффектов опосредованного фрагментами C3 внесосудистого гемолиза у субъектов с PNH, получающих лечение ингибитором C5, таким как экулизумаб.

Методы

Животная модель PNH

Образцы крови получали от генетически модифицированных мышей с дефицитом Crry и C3 (Crry/C3-/-) и мышей с дефицитом CD55/CD59. У этих мышей отсутствуют соответствующие поверхностные регуляторы комплемента и, вследствие этого, их эритроциты подвержены спонтанному аутолизу за счет комплемента, как человеческие клетки крови при PNH.

Для еще большей сенсибилизации таких эритроцитов эти клетки использовали с покрытием и без покрытия маннаном, а затем тестировали на гемолиз в плазме C56/BL6 ДТ, плазме MBL-нуль, плазме MASP-2-/-, человеческой НЧС, человеческой плазме MBL-/- и НЧС, обработанной человеческим анти-MASP-2 антителом.

1. Анализ гемолиза эритроцитов мышей с двойным дефицитом* Crry/C*3* *и* CD55/CD*59* *в* MASP-2-*дефицитных/истощенных сыворотках и контролях

День 1. Приготовление мышиных эритроцитов (± покрытие маннаном)

Материалы: свежая мышиная кровь, BBS/Mg^{2+}/Ca^{2+} (4,4 мМ барбитуровая кислота, 1,8 мМ натрий барбитал, 145 мМ NaCl, pH7,4, 5 мМ Mg^{2+}, 5 мМ Ca^{2+}), хлорид хрома, $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,5 мг/мл в BBS/Mg^{2+}/Ca^{2+}) и маннан, 100 мкг/мл в BBS /Mg^{2+}/Ca^{2+}.

Цельную кровь (2 мл) центрифугировали в течение 1-2 мин при 2000 x g в охлажденной до 4°C центрифуге. Плазму и светлый слой кровяного сгустка удаляли аспирацией. Затем образец промывали три раза путем ресуспендирования осадка эритроцитов в 2 мл ледяного раствора BBS/желатин/Mg^{2+}/Ca^{2+} и повторного центрифугирования. После третьего промывания осадок ресуспендировали в 4 мл BBS/Mg^{2+}/Ca^{2+}. 2-мл аликвоту эритроцитов отделяли для использования в качестве контроля без покрытия. К оставшимся 2 мл добавляли 2 мл $CrCl_3$ и 2 мл маннана, и образец инкубировали с осторожным перемешиванием при комнатной температуре в

течение 5 минут. Реакцию останавливали добавлением 7,5 мл раствора BBS/желатин/Mg^{2+}/Ca^{2+}. Образец центрифугировали, как описано выше, ресуспендировали в 2 мл раствора BBS/желатин/Mg^{2+}/Ca^{2+} и промывали еще два раза, как описано выше, затем хранили при 4°C.

День 2. Анализ гемолиза

Материалы: BBS/желатин/Mg^{2+}/Ca^{2+} (как описано выше), тестируемые сыворотки, 96-луночные круглодонные и плоскодонные планшеты и спектрофотометр, на котором снимают показания с 96-луночных планшетов при 410-414 нм.

Сначала определяли концентрацию эритроцитов, доводили количество клеток до 10^9/мл и хранили при этой концентрации. Перед использованием разбавляли аналитическим буфером до 10^8/мл, и использовали по 100 мкл на лунку. Гемолиз измеряли при 410-414 нм (при этом достигается большая чувствительность, чем при 541 нм). Разведения тестируемых сывороток готовили в ледяном растворе BBS/желатин/Mg^{2+}/Ca^{2+}. 100 мкл сыворотки в каждом разведении переносили пипеткой в круглодонный планшет (смотри план планшета). Добавляли 100 мкл соответствующим образом разведенного препарата эритроцитов (то есть, 10^8/мл) (смотри план планшета), инкубировали при 37°C в течение примерно 1 часа и контролировали на лизис. (На данном этапе планшеты можно фотографировать). Затем планшет центрифугировали при максимальной скорости в течение 5 минут. Отбирали 100 мкл жидкой фазы, переносили в плоскодонные планшеты и регистрировали OD при 410-414 нм. Осадки эритроцитов сохраняли (впоследствии их можно лизировать водой, чтобы получить обратный результат).

Эксперимент № 1

Получали свежую кровь от мышей с двойным дефицитом CD55/CD59 и кровь от мышей с двойным дефицитом Crry/C3, и готовили препарат эритроцитов в соответствии с протоколом, подробно описанным выше. Клетки разделяли, половину клеток покрывали маннаном, и другую половину оставляли без обработки, доводя конечную концентрацию до 1×10^8 в мл, из них 100 мкл использовали в анализе гемолиза, который проводили, как описано выше.

Результаты эксперимента № 1: Лектиновый путь вовлечен в лизис эритроцитов в животной модели PNH

В начальном эксперименте было определено, что не покрытые эритроциты мышей ДТ не лизировались ни в одной из мышиных сывороток. Также было определено, что покрытые маннаном эритроциты мышей Crry-/- лизировались медленно (более 3 часов при 37 градусах) в сыворотке мышей ДТ, однако они не лизировались в сыворотке MBL-нуль. (Данные не представлены).

Было определено, что покрытые маннаном эритроциты мышей Crry-/- быстро лизировались в человеческой сыворотке, но не в инактивированной нагреванием НЧС. Важно отметить, что покрытые маннаном эритроциты мышей Crry-/- лизировались в НЧС, разведенной до 1/640 (то есть, лизис при всех разведениях 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 и 1/640).

(Данные не представлены). При данном разведении альтернативный путь не работает (функциональная активность АП значительно снижается при концентрации сыворотки ниже 8%).

Выводы из эксперимента № 1

Покрытые маннаном эритроциты мышей Crry-/- очень хорошо лизируются в сильно разведенной человеческой сыворотке с MBL, но не в такой сыворотке без MBL. Эффективный лизис при каждой протестированной концентрации сыворотки указывает на то, что альтернативный путь не участвует, или не нужен для такого лизиса. Неспособность мышиной сыворотки, и человеческой сыворотки, с дефицитом MBL к лизису покрытых маннаном эритроцитов мышей Crry-/- указывает на то, что классический путь также не имеет отношения к наблюдаемому лизису. Поскольку необходимы молекулы узнавания лектинового пути (то есть, MBL), этот лизис опосредован лектиновым путем.

Эксперимент № 2

Получали свежую кровь от мышей с двойным дефицитом Crry/C3 и CD55/CD59, и покрытые маннаном эритроциты мышей Crry-/- анализировали в анализе гемолиза, как описано выше, в присутствии следующих человеческих сывороток: MBL-нуль; ДТ; НЧС с предварительно добавленным человеческим анти-MASP-2 антителом и инактивированная нагреванием НЧС в качестве контроля.

***Результаты эксперимента № 2: Ингибиторы* MASP-*2 предотвращают лизис эритроцитов в животной модели* PNH**

Покрытые маннаном эритроциты мышей Crry-/- инкубировали с НЧС в разведениях до 1/640 (то есть, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 и 1/640), человеческой сывороткой MBL-/-, НЧС с предварительно добавленным анти-MASP-2 мАт и инактивированной нагреванием НЧС в качестве контроля.

В анализе ELISA планшет для микротитрования центрифугировали, и не лизированные эритроциты собирали на дне круглодонного планшета. Супернатант из каждой лунки собирали, и количество гемоглобина, высвобожденного из лизированных эритроцитов, измеряли на основании OD при 415 нм в ELISA ридере.

В контрольной инактивированной нагреванием НЧС (отрицательный контроль), как и ожидалось, лизис отсутствовал. Человеческая сыворотка MBL-/- лизировала покрытые маннаном эритроциты мышей при разведениях 1/8 и 1/16. НЧС с предварительно добавленным анти-MASP-2-антителом лизировала покрытые маннаном эритроциты мышей при разведениях 1/8 и 1/16, в то время как человеческая сыворотка ДТ лизировала покрытые маннаном эритроциты мышей при разведениях до 1/32.

На ФИГУРЕ 40 приведен график, показывающий гемолиз (измеренный на основании высвобождения гемоглобина из лизированных эритроцитов мышей (Cryy/C3-/-) в супернатант фотометрическим методом) покрытых маннаном эритроцитов мышей человеческой сывороткой в диапазоне сывороточных концентраций, с использованием инактивированной нагреванием (ИН) НЧС, MBL-/-, НЧС с предварительно добавленным

анти-MASP-2 антителом и контрольной НЧС.

Результаты, представленные на ФИГУРЕ 40, показывают, что ингибирование MASP-2 анти-MASP-2 антителом приводит к значительному смещению CH_{50} и ингибирует опосредуемый комплементом лизис сенсибилизированных эритроцитов с недостаточной защитой от аутологичной активации комплемента.

Эксперимент № 3

Получали свежую кровь от мышей с двойным дефицитом Crry/C3 и CD55/CD59, и не покрытые эритроциты мышей Crry-/- анализировали в анализе гемолиза, как описано выше, в присутствии следующих сывороток: MBL-/-; сыворотка ДТ; НЧС с предварительно добавленным человеческим анти-MASP-2 антителом и инактивированная нагреванием НЧС в качестве контроля.

Результаты

На ФИГУРЕ 41 приведен график, показывающий гемолиз (измеренный на основании высвобождения гемоглобина из лизированных эритроцитов мышей ДТ в супернатант фотометрическим методом) не покрытых маннаном эритроцитов мышей человеческой сывороткой в диапазоне сывороточных концентраций, с использованием инактивированной нагреванием (ИН) НЧС, MBL-/-, НЧС с предварительно добавленным анти-MASP-2 антителом и контрольной НЧС. Как показано на ФИГУРЕ 41, ингибирование MASP-2 приводит к ингибированию опосредованного комплементом лизиса не сенсибилизированных эритроцитов мышей ДТ.

На ФИГУРЕ 42 приведен график, показывающий гемолиз (измеренный на основании высвобождения гемоглобина из лизированных эритроцитов мышей (CD55/59-/-) в супернатант фотометрическим методом) не покрытых маннаном эритроцитов мышей человеческой сывороткой в диапазоне сывороточных концентраций, с использованием инактивированной нагреванием (ИН) НЧС, MBL-/-, НЧС с предварительно добавленным анти-MASP-2 антителом и контрольной НЧС.

ТАБЛИЦА 12: ЗНАЧЕНИЯ CH_{50}, ВЫРАЖЕННЫЕ В ВИДЕ СЫВОРОТОЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ

Сыворотка	**ДТ**	**CD55/59-/-**
Инактивированная нагреванием НЧС	Без лизиса	Без лизиса
MBL AO/XX донор (дефицит MBL)	7,2%	2,1%
НЧС+анти-MASP-2 антитело	5,4%	1,5%
НЧС	3,1%	0,73%

Примечание: «CH_{50}» представляет собой точку, в которой опосредованный комплементом гемолиз достигает 50%.

Подводя итог, результаты в данном примере показывают, что ингибирование MASP-2 приводит к ингибированию опосредованного комплементом лизиса сенсибилизированных и не сенсибилизированных эритроцитов с недостаточной защитой от аутологичной активации комплемента. Таким образом, ингибиторы MASP-2 могут

быть использованы для лечения субъектов, страдающих от PNH, и также могут быть использованы для облегчения (то есть, ингибирования, предотвращения или уменьшения степени тяжести) внесосудистого гемолиза у пациентов с PNH, получающих лечение ингибитором C5, таким как экулизумаб (солирис®).

Пример 34

В данном примере описано исследование, являющееся продолжением исследования, описанного выше в примере 29, в котором были получены дополнительные доказательства того, что ингибитор MASP-2, такой как анти-MASP-2 антитело, эффективен для лечения последствий облучения и/или для лечения, облегчения или предотвращения острого лучевого синдрома.

Обоснование

В начальном исследовании, описанном в примере 29, было показано, что введение мышам анти-MASP-2 антитела перед облучением приводило к увеличению выживаемости облученных мышей, в сравнении с получавшими растворитель облученными контрольными животными, при обоих уровнях облучения, 6,5 Гр и 7,0 Гр. В примере 29 также было продемонстрировано, что при уровне облучения 6,5 Гр, введение после облучения анти-MASP-2 антитела приводило к умеренному увеличению выживаемости в сравнении с получавшими растворитель облученными контрольными животными. В данном примере описано второе исследование с облучением, которое проводили для подтверждения результатов первого исследования.

Методы

Дизайн исследования A:

Мышей линии Swiss Webster (n=50) подвергали воздействию ионизирующего излучения (8,0 Гр). Оценивали эффект на смертность терапии анти-MASP-2 антителом (мАт H6 5 мг/кг), введенным за 18 часов до, и через 2 часа после, облучения, а затем еженедельно.

Результаты исследования A:

Как показано на ФИГУРЕ 43, было установлено, что введение анти-MASP-2 антитела мАт H6 приводило к увеличению выживаемости мышей, подвергнутых облучению 8,0 Гр, с откорректированной средней выживаемостью, увеличенной с 4 до 6 дней в сравнении с мышами, получавшими контрольный растворитель, и с уменьшением смертности на 12% в сравнении с мышами, получавшими контрольный растворитель (логарифмический ранговый критерий, p=0,040).

Дизайн исследования B**:**

Мышей линии Swiss Webster (n=50) подвергали воздействию ионизирующего излучения (8,0 Гр) в следующих группах (I: растворитель) контрольный солевой раствор; (II: низкая доза) анти-MASP-2 антитело мАт H6 (5 мг/кг) вводили за 18 часов до облучения и через 2 часа после облучения; (III: высокая доза) мАт H6 (10 мг/кг) вводили за 18 часов до облучения и через 2 часа после облучения; и (IV: высокая доза после облучения) мАт H6 (10 мг/кг) вводили только через 2 часа после облучения.

Результаты исследования B:

Введение анти-MASP-2 антитела до и после облучения приводило к увеличению средней выживаемости с 4 до 5 дней, в сравнении с животными, получавшими контрольный растворитель. Смертность у получавших анти-MASP-2 антитело мышей была снижена на 6-12% в сравнении с мышами, получавшими контрольный растворитель. Также следует отметить, что какие-либо существенные вредные эффекты лечения отсутствовали (данные не представлены).

Подводя итог, результаты, описанные в данном примере, согласуются с результатами, описанными в примере 29, и также показывают, что анти-MASP-2 антитела эффективны в лечении субъекта-млекопитающего, имеющего риск развития, или страдающего от, разрушительных эффектов острого лучевого синдрома.

Пример 35

В данном исследовании изучали эффект дефицита MASP-2 в мышиной модели LPS (липополисахарид)-индуцированного тромбоза.

Обоснование

Гемолитический уремический синдром (HUS), являющийся следствием инфекции, вызываемой продуцирующей шига-токсин E. coli, является основной причиной острой почечной недостаточности у детей. В данном примере модель Шварцмана LPS-индуцированного тромбоза (микроваскулярной коагуляции) создавали на мышах MASP-2-/- (KO) для определения того, будет ли ингибирование MASP-2 эффективным для ингибирования или предотвращения образования внутрисосудистых тромбов.

Методы

Мышей MASP-2-/- (n=9) и ДТ (n=10) анализировали в модели Шварцмана LPS-индуцированного тромбоза (микроваскулярной коагуляции). Мышам вводили LPS Serratia и контролировали образование тромбов с течением времени. Проводили сравнение частоты случаев микротромбов и LPS-индуцированной микроваскулярной коагуляции.

Результаты

Примечательно, что ни у одной из протестированных мышей MASP-2-/- (9/9) не образовались внутрисосудистые тромбы после введения LPS Serratia. Напротив, микротромбы были обнаружены у 7 из 10 мышей ДТ, протестированных параллельно (p=0,0031, точный критерий Фишера). Как показано на ФИГУРЕ 44, было измерено время до начала микроваскулярной окклюзии после введения LPS у мышей MASP-2-/- и ДТ, и показана процентная доля мышей ДТ с образованием тромбов, определенным в течение 60 минут, при этом образование тромбов было обнаружено уже через примерно 15 минут. Вплоть до 80% мышей ДТ имели образовавшиеся тромбы через 60 минут. Напротив, как показано на ФИГУРЕ 44, ни у одной из мышей MASP-2-/- не были образованы тромбы через 60 минут (логарифмический ранговый критерий: p=0,0005).

Эти результаты показывают, что ингибирование MASP-2 защищает от образования внутрисосудистых тромбов в модели HUS.

Пример 36

В данном примере описан эффект анти-MASP-2 антител в мышиной модели HUS при совместном внутрибрюшинном введении инъекцией очищенного шига-токсина 2 (STX2) плюс LPS.

Предпосылки

Мышиная модель HUS была разработана с использованием совместного внутрибрюшинного введения инъекцией очищенного шига-токсина 2 (STX2) плюс LPS. Биохимический и микроматричный анализ почек мышей показал, что результат введения STX2 плюс LPS отличается от эффектов введения каждого средства в отдельности. Анализ крови и сыворотки этих мышей показал наличие нейтрофилии, тромбоцитопении, гемолиза эритроцитов и повышенных сывороточных уровней креатинина и азота мочевины крови. Кроме того, гистологический и электронно-микроскопический анализ почек мышей показал отложение фибрина в клубочках, застой эритроцитов, образование микротромбов и изменения ультраструктуры клубочков. Было установлено, что данная модель HUS на мышах C57BL/6 имеет все клинические симптомы патологии HUS человека, включая тромбоцитопению, гемолитическую анемию и почечную недостаточность, которые определяют заболевание человека. (J. Immunol 187(1):172-80 (2011))

Методы

Самок мышей C57BL/6 с массой тела 18-20 г приобретали у компании Charles River Laboratories и разделяли на 2 группы (по 5 мышей в каждой группе). Мышам в одной группе предварительно вводили внутрибрюшинной (в/б) инъекцией рекомбинантное анти-MASP-2 антитело мАт M11 (100 мкг на мышь; что соответствовало конечной дозе 5 мг/кг массы тела), разведенное в общем объеме 150 мкл солевого раствора. Животные в контрольной группе получали солевой раствор без антитела. Через шесть часов после в/б инъекции анти-MASP-2 антитела мАт M11 все мыши получали комбинированную в/б инъекцию сублетальной дозы (3 мкг/животное; что соответствовало 150 мкг/кг массы тела) LPS из Serratia marcescens (L6136; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) и дозу 4,5 нг/животное (что соответствовало 225 нг/кг) STX2 (двукратная доза LD_{50}) в общем объеме 150 мкл. Инъекцию солевого раствора использовали в качестве контроля.

Выживаемость мышей контролировали каждые 6 часов после дозирования. Мышей умерщвляли, как только они достигали летаргической стадии патологии HUS. Через 36 часов всех мышей умерщвляли и извлекали обе почки для анализа методами иммуногистохимии и сканирующей электронной микроскопии. Образцы крови собирали в конце эксперимента путем прокола сердца. Получали сыворотку и хранили ее замороженной при -80°C для измерения уровней BUN и сывороточного креатинина как в экспериментальной, так и в контрольной, группах.

Иммуногистохимия

Одну треть каждой мышиной почки фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 24 ч, обрабатывали и заливали парафином. Получали срезы толщиной три

микрона и помещали на заряженные предметные стекла для последующего окрашивания красителем H & E.

Электронная микроскопия

Среднюю секцию почек нарезали на блоки размером примерно 1-2 мм^3 и фиксировали в течение ночи при 4°C в 2,5% растворе глутаральдегида в 1x PBS. Затем фиксированная ткань была обработана в Корпусе электронной микроскопии Университета Лестера.

Криостатные срезы

Другую треть почек нарезали на блоки размером примерно 1-2 мм^3, быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C для получения криостатных срезов и анализа мРНК.

Результаты

На ФИГУРЕ 45 приведен график, показывающий выживаемость, в процентах, получавших солевой раствор контрольных мышей (n=5) и получавших анти-MASP-2 антитело мышей (n=5) в модели, индуцированной STX/LPS, с течением времени (часы). Примечательно, что, как показано на ФИГУРЕ 45, все из контрольных мышей погибли через 42 часа. В резком контрасте, 100% получавших анти-MASP-2 антитело мышей выжили на протяжении всего эксперимента. В соответствии с результатами, представленными на ФИГУРЕ 45, было обнаружено, что все не получавшие препарат мыши, которые либо погибли, либо были умерщвлены с признаками тяжелого заболевания, имели значительные повреждения клубочков, при этом клубочки всех получавших анти-MASP-2 мышей выглядели нормальными (данные не представлены). Эти результаты показывают, что ингибиторы MASP-2, такие как анти-MASP-2 антитела, могут быть использованы для лечения субъектов, страдающих от, или имеющих риск развития, тромботической микроангиопатии (TMA), такой как гемолитический уремический синдром (HUS), атипичный HUS (aHUS) или тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (TTP).

Пример 37

В данном примере описан эффект дефицита MASP-2 и ингибирования MASP-2 при индуцированном у мышей FITC-декстраном/светом повреждении эндотелиальных клеток, являющемся моделью тромбоза.

Предпосылки/обоснование

Как показано в примерах 35 и 36, дефицит MASP-2 (MASP-2 KO) и ингибирование MASP-2 (путем введения ингибирующего анти-MASP-2 антитела) защищает мышей в модели типичного HUS, в то время как у всех контрольных мышей, подвергнутых воздействию STX и LPS, развивался тяжелый HUS, и они находились в предсмертном состоянии или погибали в пределах 48 часов. Например, как показано на ФИГУРЕ 54, все мыши, получавшие анти-MASP-2 ингибирующее антитело, а затем подвергнутые воздействию STX и LPS, выживали (точный критерий Фишера $p<0,01$; N=5). Таким образом, введение анти-MASP-2 защищает мышей в данной модели HUS.

Проводили следующие эксперименты для анализа эффекта дефицита MASP-2 и ингибирования MASP-2 при индуцированном флуоресцеин изотиоцианат (FITC)-декстраном повреждении эндотелиальных клеток, являющемся моделью тромботической микроангиопатии (TMA), для дополнительной демонстрации пользы ингибиторов MASP-2 в лечении HUS, aHUS, TTP, а также TMA с другой этиологией.

Методы

Прижизненная микроскопия

Мышей готовили для прижизненной микроскопии, как описано в публикации Frommhold et al., BMC Immunology 12:56-68, 2011. Вкратце, мышей анестезировали внутрибрюшинной (в/б) инъекцией кетамина (125 мг/кг массы тела, кетанест, Pfitzer GmbH, Karlsruhe, Germany) и ксилазина (12,5 мг/кг массы тела; ромпан, Bayer, Leverkusen, Germany) и помещали на теплую подложку для поддержания температуры тела на уровне 37°C. Прижизненную микроскопию проводили при помощи вертикального микроскопа (Leica, Wetzlar, Germany), используя иммерсионный объектив с солевым раствором (SW 40/0,75 числовая апертура, Zeiss, Jena, Germany). Для облегчения дыхания мышей интубировали с использованием трубки PE 90 (Becton Dickson and Company, Sparks, MD, USA). Левую сонную артерию каннюлировали трубкой PE10 (Becton Dickson and Company, Sparks, MD, USA) для отбора крови и системного введения моноклонального антитела (мАт).

Подготовка мышцы, поддерживающей яичко

Хирургическую подготовку мышцы, поддерживающей яичко, для прижизненной микроскопии выполняли, как описано в публикации Sperandio et al., Blood, 97:3812-3819, 2001. Вкратце, мошонку открывали и обеспечивали подвижность мышцы, поддерживающей яичко. После продольного разреза и размещения мышцы на покровном стекле придаток яичка и яичко сдвигали и прижимали в сторону, обеспечивая полный доступ для микроскопа к микроваскулярной системе мышцы, поддерживающей яичко. Производили запись венул мышцы, поддерживающей яичко, с использованием камеры CCD (CF8/1; Kappa, Gleichen, Germany) на записывающем устройстве Panasonic S-VHS. Мышцу, поддерживающую яичко, обливали бикарбонатным буфером с солевым раствором с контролируемой температурой (35°C), как ранее описано в публикации Frommhold et al., BMC Immunology 12:56-68, 20112011.

Модель повреждения, вызываемая FITC-декстраном при возбуждении светом

Контролируемое, зависимое от дозы светового излучения повреждение сосудистого эндотелия венул и артериол в мышце, поддерживающей яичко, индуцировали за счет возбуждения светом фототоксического (FITC)-декстрана (каталожный № FD150S, Sigma Aldrich, Poole, U.K.). Эта процедура запускает локализованный тромбоз. 60 мкл 10% масс/об раствора FITC-декстрана в качестве фототоксического реагента вводили инъекцией через левую сонную артерию и позволяли однородно распределяться по системе кровообращения в течение 10 минут. После выбора хорошо перфузированной венулы свет галогеновой лампы с интенсивностью от низкой до средней (800-1500)

фокусировали на интересующем сосуде, индуцируя флуоресценцию FITC-декстрана и слабую или умеренную фототоксичность для поверхности эндотелия с целью стимулирования тромбоза воспроизводимым, контролируемым образом. Необходимую фототоксическую интенсивность света для возбуждения FITC-декстрана создавали с использованием галогеновой лампы (12 В, 100 Вт, Zeiss, Oberkochen, Germany). Для фототоксичности, возникающей вследствие индуцированного светом возбуждения флуорохрома, необходима пороговая интенсивность света и/или продолжительность освещения, и фототоксичность бывает вызвана либо прямым нагреванием эндотелиальной поверхности, либо образованием активных кислородных радикалов, как описано в публикации Steinbauer et al., Langenbecks Arch Surg 385:290-298, 2000.

Интенсивность света, применяемую к каждому сосуду, измеряли для регулирования при помощи диодного детектора с коррекцией длины волны для измерений малой мощности (Labmaster LM-2, Coherent, Auburn, USA). Автономный анализ видео-сканов проводили с использованием компьютерной системы анализа микроциркуляции (CAMAS, Dr. Zeintl, Heidelberg), и скорость эритроцитов измеряли, как описано в публикации Zeintl et al., Int J Microcirc Clin Exp, 8(3):293-302, 2000.

Применение моноклонального ингибирующего антитела против человеческого MASP-2 (мАт H6) и контрольного растворителя перед индукцией тромбоза

Используя «слепой» дизайн исследования, самцам-однопометникам мышей C57BL/6 ДТ в возрасте 9 недель вводили в/б инъекциями либо рекомбинантное моноклональное антитело против человеческого MASP-2 (мАт H6), ингибитор функциональной активности MASP-2 (в конечной дозе 10 мг/кг массы тела), либо такое же количество контрольного по изотипу антитела (без ингибирующей MASP-2 активности) за 16 часов до фототоксической индукции тромбоза в мышце, поддерживающей яичко, модели для прижизненной микроскопии. За час до индукции тромбоза вводили вторую дозу либо мАт H6, либо контрольного антитела. Мышей с нокаутом (KO) MASP-2 также оценивали в данной модели.

мАт H6 (полученное к рекомбинантному человеческому MASP-2) является сильным ингибитором функциональной активности человеческого MASP-2, которое перекрестно реагирует, связывает и ингибирует мышиный MASP-2, но с более низкой аффинностью вследствие его специфичности для биологического вида (данные не представлены). Для компенсации более низкой аффинности мАт H6 для мышиного MASP-2, мАт H6 вводили в более высокой дозе (10 мг/кг массы тела) с целью преодоления различий в видовой специфичности и меньшей аффинности в отношении мышиного MASP-2, и обеспечения эффективного блокирования функциональной активности мышиного MASP-2 в условиях in vivo.

В данном «слепом» исследовании регистрировали время, необходимое для полной окклюзии каждой отдельной протестированной венулы (критериями выбора были сопоставимые диаметры и скорости кровотока).

Процентную долю мышей с окклюзией микрососудов, время до начала и время до полной окклюзии оценивали в течение 60-минутного периода наблюдения, используя видеозапись процедуры прижизненной микроскопии.

Результаты

На ФИГУРЕ 46 приведен график, показывающий, в зависимости от времени после индукции повреждения, процентную долю мышей с окклюзией микрососудов в модели с УФ возбуждением FITC/декстрана после введения изотипического контроля или антитела против человеческого MASP-2 мАт H6 (10 мг/кг) за 16 часов и 1 час до инъекции FITC/декстрана. Как показано на ФИГУРЕ 46, у 85% мышей дикого типа, получавших контрольное по изотипу антитело, происходила окклюзия в течение 30 минут или менее, в то время как лишь у 19% мышей дикого типа, предварительно получавших антитело против человеческого MASP-2 (мАт H6), происходила окклюзия в течение этого периода времени, и начало окклюзии было отсрочено у мышей, у которых в итоге происходила окклюзия, в группе получения антитела против человеческого MASP-2. Также было отмечено, что у трех мышей, получавших анти-MASP-2 мАт H6, окклюзия не происходила в течение всего 60-минутного периода наблюдения (то есть, они были защищены от тромботической окклюзии).

На ФИГУРЕ 47 приведен график, показывающий время до окклюзии, в минутах, для мышей, получавших антитело против человеческого MASP-2 (мАт H6) и контрольное по изотипу антитело. Данные представлены в виде диаграммы рассеяния со средними значениями (горизонтальные черты) и планками стандартных погрешностей (вертикальные черты). На данной фигуре показано время до окклюзии у мышей, у которых окклюзию можно было наблюдать. Таким образом, три получавшие анти-MASP-2 антитело мыши, у которых не происходила окклюзия в течение 60-минутного периода наблюдения, не были включены в данный анализ (у всех контрольных мышей происходила окклюзия). Для статистического анализа использовали непарный критерий Стьюдента; при этом символ «*» соответствует p=0,0129. Как показано на ФИГУРЕ 47, у четырех получавших анти-MASP-2 антитело (мАт H6) мышей, у которых происходила окклюзия, введение анти-MASP-2 антитела приводило к значительному увеличению периода времени до окклюзии венул в модели тромбоза, представляющей собой индуцированное FITC-декстраном/светом повреждение эндотелиальных клеток при низкой интенсивности света (800-1500), в сравнении с мышами, получавшими контрольное по изотипу антитело. Среднее время до полной окклюзии в группе изотипического контроля составляло 19,75 минут, в то время как среднее время до полной окклюзии в группе животных, получавших анти-MASP-2 антитело, составляло 32,5 минут.

На ФИГУРЕ 48 приведен график, показывающий время до окклюзии, в минутах, для мышей дикого типа, мышей MASP-2 KO и мышей дикого типа, предварительно получавших антитело против человеческого MASP-2 (мАт H6), введенное в/б в дозе 10 мг/кг за 16 часов до, а затем вновь введенное в/в за 1 час до, индукции тромбоза в модели тромбоза, представляющей собой индуцированное FITC-декстраном/светом повреждение

эндотелиальных клеток при низкой интенсивности света (800-1500). Лишь данные для животных, у которых происходила окклюзия, включены на ФИГУРЕ 48; n=2 для мышей дикого типа, получавших контрольное по изотипу антитело; n=2 для MASP-2 KO; и n=4 для мышей дикого типа, получавших антитело против человеческого MASP-2 (мАт H6). Символ «*» соответствует $p<0,01$. Как показано на ФИГУРЕ 48, дефицит MASP-2 и ингибирование MASP-2 (мАт H6 в дозе 10 мг/кг) приводили к увеличению времени до венозной окклюзии в модели тромбоза, представляющей собой индуцированное FITC-декстраном/светом повреждение эндотелиальных клеток при низкой интенсивности света (800-1500).

Выводы

Результаты в данном примере дополнительно показывают, что ингибирующее MASP-2 средство, которое блокирует лектиновый путь (например, антитела, которые блокируют функцию MASP-2), ингибирует микроваскулярную коагуляцию и тромбоз, характерные признаки многих микроангиопатических заболеваний, в мышиной модели TMA. Таким образом, ожидается, что введение ингибирующего MASP-2 средства, такого как ингибирующее MASP-2 антитело, будет эффективным методом лечения пациентов, страдающих от HUS, aHUS, TTP или других микроангиопатических заболеваний, и обеспечит защиту от микроваскулярной коагуляции и тромбоза.

Пример 38

В данном примере описано исследование, демонстрирующее, что человеческое ингибирующее MASP-2 антитело (мАт H6) не влияет на функцию тромбоцитов в богатой тромбоцитами человеческой плазме.

Предпосылки/обоснование

Как описано в примере 37, было показано, что ингибирование MASP-2 человеческим ингибирующим MASP-2 антителом (мАт H6), приводит к увеличению времени до венозной окклюзии в модели тромбоза, представляющей собой индуцированное FITC-декстраном/светом повреждение эндотелиальных клеток. Проводили следующий эксперимент для определения того, влияет ли ингибирующее MASP-2 антитело (мАт H6) на функцию тромбоцитов.

Методы

Тестировали эффект человеческого анти-MASP-2 антитела мАт H6 на индуцированную АДФ агрегацию тромбоцитов следующим образом. Человеческое анти-MASP-2 мАт H6 в концентрации либо 1 мкг/мл, либо 0,1 мкг/мл, добавляли в количестве 40 мкл раствора к 360 мкл свежеприготовленной богатой тромбоцитами человеческой плазмы. Контрольное по изотипу антитело использовали в качестве отрицательного контроля. После добавления антител к плазме индуцировали активацию тромбоцитов путем добавления АДФ до конечной концентрации 2 мкМ. Анализ начинали перемешиванием растворов небольшим магнитом в 1-мл кювете. Агрегацию тромбоцитов измеряли на двухканальном приборе для измерения агрегации тромбоцитов Chrono-log модели 700 Whole Blood/Optical Lumi-Aggregometer.

Результаты

Агрегацию, в процентах, в растворах измеряли в течение пяти минут. Результаты приведены ниже в ТАБЛИЦЕ 13.

ТАБЛИЦА 13: АГРЕГАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ В ТЕЧЕНИЕ ПЯТИ МИНУТ

Антитело	**Амплитуда (агрегация, %)**	**Угол наклона (агрегация, %, с течением времени)**
Анти-MASP-2 антитело (мАт H6) (1 мкг/мл)	46%	59
Контрольное по изотипу антитело (1 мкг/мл)	49%	64
Анти-MASP-2 антитело (мАт H6) (0,1 мкг/мл)	52%	63
Контрольное по изотипу антитело (0,1 мкг/мл)	46%	59

Как показано выше в ТАБЛИЦЕ 13, отсутствовала существенная разница между агрегацией индуцированных АДФ тромбоцитов, обработанных контрольным антителом или анти-MASP-2 антителом мАт H6. Эти результаты показывают, что человеческое анти-MASP-2 антитело (мАт H6) не влияет на функцию тромбоцитов. Таким образом, результаты, описанные в примере 37, показывающие, что ингибирование MASP-2 человеческим ингибирующим MASP-2 антителом (мАт H6) приводило к увеличению времени до венозной окклюзии в модели тромбоза, представляющей собой индуцированное FITC-декстраном/светом повреждение эндотелиальных клеток, не являлись следствием эффекта мАт H6 на функцию тромбоцитов. Таким образом, ингибирование MASP-2 предотвращает тромбоз, не оказывая прямого влияния на функцию тромбоцитов, это свидетельствует о том, что механизм терапевтического действия отличается от имеющихся противотромботических средств.

Пример 39

В данном примере описан эффект ингибирования MASP-2 на образование тромбов и окклюзию сосудов в мышиной модели ТМА.

Предпосылки/обоснование

Лектиновый путь играет основную роль в активации системы комплемента в условиях стресса и повреждения эндотелиальных клеток. Эта активация быстро усиливается в альтернативном пути, который нарушен у многих пациентов, имеющих aHUS. Вследствие этого ожидается, что предотвращение активации MASP-2 и лектинового пути будет останавливать последовательность ферментативных реакций, приводящую к образованию мембраноатакующего комплекса, активации тромбоцитов и

рекрутингу лейкоцитов. Этот эффект ограничивает повреждение тканей.

Кроме того, MASP-2 имеет активность, подобную активности фактора Xa, и расщепляет протромбин, с образованием тромбина. Эта регулируемая MASP-2 активация системы коагуляции может нарушать гемостаз и приводить к патологии TMA. Таким образом, ожидается, что ингибирование MASP-2 при помощи ингибитора MASP-2, такого как ингибирующее MASP-2 антитело, которое блокирует активацию систем комплемента и коагуляции, будет улучшать исход при aHUS и других аналогичных состояниях TMA.

Как описано в примере 37, было продемонстрировано, что ингибирование MASP-2 человеческим ингибирующим MASP-2 антителом (мАт H6) увеличивало время до венозной окклюзии в модели тромбоза, представляющей собой индуцированное FITC-декстраном/светом повреждение эндотелиальных клеток. В данной модели TMA мышей сенсибилизировали путем в/в инъекции FITC-декстрана, с последующей локализованной фотоактивацией FITC-декстрана в микроваскулярной сети мышцы, поддерживающей яичко (Thorlacius H et al., Eur J Clin. Invest 30(9):804-10, 2000; Agero et al., Toxicon 50(5):698-706, 2007).

Проводили следующий эксперимент для определения того, имеет ли ингибирующее MASP-2 антитело (мАт H6) зависимый от дозы эффект на образование тромбов и окклюзию сосудов в мышиной модели TMA.

Методы

Локализованный тромбоз индуцировали путем фотоактивации меченого флуоресцеин изотиоцианатом декстрана (FITC-декстран) в микроваскулярной сети мышцы, поддерживающей яичко, у мышей C57Bl/6, и использовали прижизненную микроскопию для определения времени начала образования тромбов и окклюзии сосудов, используя способы, описанные в примере 37, со следующими модификациями. Группам мышей вводили мАт H6 (2 мг/кг, 10 мг/кг или 20 мг/кг) или контрольное по изотипу антитело (20 мг/кг) внутривенной (в/в) инъекцией за один час до индукции TMA. Регистрировали время до начала образования тромбов и время до полной окклюзии сосудов. Последующий анализ видеоизображений прижизненной микроскопии, записанных в течение 30-60 минут, использовали для оценки размера сосудов, скорости кровотока, интенсивности света, скорости в начале образование тромбов как эквивалента адгезии тромбоцитов, время до начала образования тромбов, скорость полной окклюзии сосудов и время до полной окклюзии сосудов. Статистический анализ проводили с использованием программы SigmaPlot v 12.0.

Результаты

Инициация образования тромбов

На ФИГУРЕ 49 представлен график Каплана-Мейера, показывающий процентную долю мышей с тромбами, в зависимости от времени, в модели индуцированной FITC-декстраном тромботической микроангиопатии у мышей, получавших возрастающие дозы человеческого ингибирующего MASP-2 антитела (мАт H6 в дозах 2 мг/кг, 10 мг/кг или 20 мг/кг) или контрольное по изотипу антитело. Как показано на ФИГУРЕ 49, начало

образования тромбов было отсрочено у получавших мАт H6 мышей зависимым от дозы образом в сравнении с получавшими контрольное антитело мышами.

На ФИГУРЕ 50 приведен график, показывающий среднее время (минуты) до начала образования тромбов в зависимости от дозы мАт H6 (*p<0,01 в сравнении с контролем). Как показано на ФИГУРЕ 50, среднее время до начала образование тромбов возрастало с увеличением дозы мАт H6 от 6,8 минут в контрольной группе до 17,7 минут в группе животных, получавших 20 мг/кг мАт H6 (p<0,01). Служащие основой экспериментальные данные и результаты статистического анализа приведены в ТАБЛИЦАХ 14 и 15.

Время до начала образования тромбов у отдельных мышей, зарегистрированное на основании оценки видеозаписи, приведено ниже в ТАБЛИЦЕ 14.

ТАБЛИЦА 14: ВРЕМЯ ДО НАЧАЛА ОБРАЗОВАНИЯ ТРОМБОВ ПОСЛЕ ИНДУЦИРОВАННОГО СВЕТОМ/КРАСИТЕЛЕМ ПОВРЕЖДЕНИЯ

Контрольное воздействие		**Воздействие мАт H6**		
Время до начала (минуты)	**Контроль**	**2 мг/кг**	**10 мг/кг**	**20 мг/кг**
	6,07	5,93	12,75	10,00
	1,07	6,95	2,53	10,33
	8,00	8,92	14,00	21,00
	2,40	11,92	3,05	11,50
	8,48	12,75	8,00	19,00
	4,00	12,53	8,17	10,37
	4,00		15,83	22,65
	7,83		11,70	16,37
	6,83		50,67	21,75*
	15,00			32,25*
	15,67			

*В сосудах не наблюдали тромбоз в течение указанного периода наблюдения

Результаты статистического анализа, в котором сравнивали время до начала окклюзии у животных, получавших контрольное антитело и мАт H6, приведены ниже в ТАБЛИЦЕ 15.

ТАБЛИЦА 15: ВРЕМЯ ДО НАЧАЛА ОККЛЮЗИИ: ДАННЫЕ ЗАВИСИМОСТИ ОТВЕТА ОТ ДОЗЫ ИЗ ИССЛЕДОВАНИЯ С FITC-ДЕКСТРАНОМ

Статистический параметр	**Контроль**	**мАт H6 (2 мг/кг)**	**мАт H6 (10 мг/кг)**	**мАт H6 (20 мг/кг)**
Число событий/число животных (%)	11/11 (100%)	6/6 (100%)	9/9 (100%)	8/10 (80,0%)
Среднее время (минуты) (95%	6,8	10,4	11,7	17,7

ДИ)	(2,4, 8,5)	(5,9, 12,8)	(2,5, 15,8)	(10,0, 22,7)
Критерий Вилкоксона, p-значение*		0,2364	0,1963	0,0016
Событие=Наблюдаемое время до начала окклюзии Среднее значение (минуты) и его 95% ДИ основаны на оценке Каплана-Мейера Н/О=не поддается оценке *p-значения были скорректированы методом множественного сравнения Даннета-Хсу				

Микроваскулярная окклюзия

На ФИГУРЕ 51 представлен график Каплана-Мейера, показывающий процентную долю мышей с микроваскулярной окклюзией, в зависимости от времени, в модели индуцированной FITC-декстраном тромботической микроангиопатии у мышей, получавших возрастающие дозы человеческого ингибирующего MASP-2 антитела (мАт H6 в дозах 2 мг/кг, 10 мг/кг или 20 мг/кг) или контрольное по изотипу антитело. Как показано на ФИГУРЕ 51, полная микроваскулярная окклюзия была отсрочена в группах мышей, получавших мАт H6, в сравнении с контрольными мышами.

На ФИГУРЕ 52 приведен график, показывающий среднее время до микроваскулярной окклюзии в зависимости от дозы мАт H6 (*$p<0,05$ в сравнении с контролем). Как показано на ФИГУРЕ 52, среднее время до полной микроваскулярной окклюзии увеличено от 23,3 минут в контрольной группе до 38,6 минут в группе получения 2 мг/кг мАт H6 ($p<0,05$). Дозы 10 мг/кг или 20 мг/кг мАт H6 действовали аналогично (среднее время до полной микроваскулярной окклюзии составляло 40,3 и 38 минут, соответственно) дозе 2 мг/кг мАт H6. Служащие основой экспериментальные данные и результаты статистического анализа приведены в ТАБЛИЦАХ 16 и 17.

Время до полной окклюзии сосудов у отдельных мышей, зарегистрированное на основании оценки видеозаписи, приведено ниже в ТАБЛИЦЕ 16.

ТАБЛИЦА 16: ВРЕМЯ ДО ПОЛНОЙ ОККЛЮЗИИ ПОСЛЕ ИНДУЦИРОВАННОГО СВЕТОМ/КРАСИТЕЛЕМ ПОВРЕЖДЕНИЯ

Контрольное воздействие		**Воздействие мАт H6**		
Время до окклюзии (минуты)	**Контроль**	**2 мг/кг**	**10 мг/кг**	**20 мг/кг**
	37,50	42,3	30,92	38,00
	29,07	21,91	17,53	28,00
	27,12	24,4	51,38	40,58
	19,38	31,38	36,88	33,00
	19,55	61,17*	26,83	39,10
	18,00	61,55*	40,28	32,03
	16,50		55,83	38,53
	23,33		71,93*	21,75*

	14,83		98,22*	32,25*
	30*			33,17*
	61,8*			

*В сосудах отсутствовала полная окклюзия в течение указанного периода наблюдения.

Результаты статистического анализа, в котором сравнивали время до полной окклюзии у животных, получавших контрольное антитело и мАт H6, приведены ниже в ТАБЛИЦЕ 17.

ТАБЛИЦА 17: ВРЕМЯ ДО ПОЛНОЙ МИКРОВАСКУЛЯРНОЙ ОККЛЮЗИИ: ДАННЫЕ ЗАВИСИМОСТИ ОТВЕТА ОТ ДОЗЫ ИЗ ИССЛЕДОВАНИЯ С FITC-ДЕКСТРАНОМ

Статистический параметр	**Контроль**	**мАт H6 (2 мг/кг)**	**мАт H6 (10 мг/кг)**	**мАт H6 (20 мг/кг)**
Число событий/число животных (%)	9/11 (81,8%)	4/6 (66,7%)	7/9 (77,8%)	7/10 (70,0%)
Среднее время (минуты) (95% ДИ)	23,3 (16,5, 37,5)	36,8 (21,9, Н/О)	40,3 (17,5, Н/О)	38,0 (28,0, 40,6)
Критерий Вилкоксона, p-значение*		0,0456	0,0285	0,0260
Событие=Наблюдаемое время до окклюзии Среднее значение (минуты) и его 95% ДИ основаны на оценке Каплана-Мейера Н/О=не поддается оценке *p-значения были скорректированы методом множественного сравнения Даннета-Хсу				

Резюме

Как показано в ТАБЛИЦЕ 18, начало образования тромбов было отсрочено у получавших мАт H6 мышей зависимым от дозы образом в сравнении с получавшими контрольное антитело мышами (среднее время до начала 10,4-17,7 минут против 6,8 минут). Среднее время до полной окклюзии было значительно увеличено во всех группах животных, получавших мАт H6, относительно получавших контрольное антитело животных (Таблица 18).

ТАБЛИЦА 18: СРЕДНЕЕ ВРЕМЯ ДО НАЧАЛА ОБРАЗОВАНИЯ ТРОМБОВ И ПОЛНОЙ ОККЛЮЗИИ

	Контроль	**мАт H6 (2 мг/кг)**	**мАт H6 (10 мг/кг)**	**мАт H6 (20 мг/кг)**
Среднее[#] время до начала	6,8	10,4	11,7	17,7*

образования тромбов (минуты)				
Среднее[#] время до полной микроваскулярной окклюзии (минуты)	23,3	36,8*	40,3*	38,0*

Средние значения основаны на оценке Каплана-Мейера

*$p<0,05$ в сравнении с контролем (критерий Вилкоксона, скорректированный методом множественного сравнения Даннета-Хсу)

Эти результаты показывают, что мАт H6, человеческое моноклональное антитело, которое связывает MASP-2 и блокирует лектиновый путь системы комплемента, приводит к уменьшению микроваскулярного тромбоза зависимым от дозы образом в экспериментальной мышиной модели TMA. Таким образом, ожидается, что введение ингибирующего MASP-2 средства, такого как ингибирующее MASP-2 антитело, будет эффективным методом лечения пациентов, страдающих от HUS, aHUS, TTP, или других микроангиопатических заболеваний, таких как другие TMA, включая катастрофический антифосфолипидный синдром (CAPS), системную болезнь Дегоса, а также TMA вследствие рака, противораковой химиотерапии и трансплантации, и обеспечит защиту от микроваскулярной коагуляции и тромбоза.

Пример 40

В данном примере описана идентификация при помощи фагового дисплея полностью человеческих scFv антител, которые связывают MASP-2 и ингибируют опосредованную лектином активацию комплемента, не затрагивая компоненты классического (C1q-зависимого) пути и альтернативного пути иммунной системы.

Обзор

Полностью человеческие высокоаффинные анти-MASP-2 антитела были идентифицированы при скрининге библиотеки фагового дисплея. Фрагменты вариабельных областей легкой и тяжелой цепей антител были выделены как в формате scFv, так и в формате полноразмерных IgG. Человеческие анти-MASP-2 антитела являются полезными для ингибирования повреждения клеток, связанного с опосредованной лектиновым путем активацией альтернативного пути комплемента, не затрагивающего компонент классического (C1q-зависимого) пути иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления указанные ингибирующие MASP-2 антитела имеют следующие характеристики: (a) высокую аффинность для человеческого MASP-2 (например, величину K_D, составляющую 10 нМ или менее) и (b) ингибируют MASP-2-зависимую активность комплемента в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее.

Методы

***Экспрессия полноразмерного каталитически неактивного* MASP-2**:

Полноразмерную последовательность кДНК человеческого MASP-2 (SEQ ID NO: 4), кодирующую полипептид человеческого MASP-2 с последовательностью лидера (SEQ

ID NO: 5), субклонировали в экспрессионный вектор pCI-Neo (Promega) млекопитающих, который управляет экспрессией под контролем области энхансера/промотора CMV в эукариотических клетках (описано в Kaufman R.J. et al., Nucleic Acids Research 19:4485-90, 1991; Kaufman, Methods in Enzymology, 185:537-66 (1991)).

Для получения каталитически неактивного человеческого белка MASP-2A проводили сайт-направленный мутагенез, как описано в US2007/0172483, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Продукты ПЦР очищали после электрофореза в агарозном геле и обработки полосы, и создавали одиночные наложения аденозина с использованием стандартного метода наращивания цепи. MASP-2A с аденозиновым «хвостом» затем клонировали в вектор pGEM-T easy и вводили трансформацией в E. coli. Человеческий MASP-2A дополнительно субклонировали в какой-либо из экспрессионных векторов pED или pCI-Neo млекопитающих.

Экспрессионный конструкт MASP-2A, описанный выше, трансфицировали в клетки DXB1 стандартным методом трансфекции с фосфатом кальция (Maniatis et al., 1989). MASP-2A получали в бессывороточной среде для гарантии того, что препараты не будут загрязнены другими сывороточными белками. Среду собирали с конфлюэнтных клеток через день (всего четыре раза). Уровень рекомбинантного MASP-2A составлял в среднем примерно 1,5 мг/литр культуральной среды. Мутант MASP-2A (мутант Ser-Ala, описанный выше) очищали аффинной хроматографией на колонке с MBP-A-агарозой.

MASP-2A ELISA *клонов-кандидатов* scFv, *идентифицированных путем сортировки/преобразования* scFv *и фильтрующего скрининга*

Фагово-дисплейную библиотеку последовательностей вариабельных областей легкой и тяжелой цепей человеческих иммуноглобулинов подвергали сортировке на антиген, с последующим автоматизированным скринингом и отбором антител, для идентификации высокоаффинных scFv антител к человеческому белку MASP-2. Проводили три раунда сортировки фаговой библиотеки scFv против HIS-меченого или биотин-меченого MASP-2A. В третьем раунде сортировки элюцию проводили сначала при помощи MBL, а затем TEA (щелочного). Для мониторинга специфического обогащения фагов, экспонирующих фрагменты scFv против целевого MASP-2A, проводили ELISA поликлональных фагов против иммобилизованного MASP-2A. Гены scFv, полученных в раунде 3 сортировки, клонировали в экспрессионный вектор pHOG и использовали в мелкомасштабном фильтрующем скрининге для обнаружения специфических клонов против MASP-2A.

Колонии бактерий, содержащих плазмиды, кодирующие фрагменты scFv из третьего раунда сортировки, отбирали, наносили в виде сетки на нитроцеллюлозные мембраны и выращивали в течение ночи на не индуцирующей среде для получения мастер-чашек. Всего было отобрано и проанализировано 18000 колоний из третьего раунда сортировки, половина после конкурентной элюции и половина после последующей элюции TEA. Сортировка фагмидной библиотеки scFv против MASP-2A, с последующим преобразованием scFv и фильтрующим скринингом, привели к получению 137

положительных клонов. 108/137 клонов были положительны в анализе ELISA на связывание MASP-2 (данные не представлены), из которых 45 клонов были дополнительно проанализированы на способность к блокированию активности MASP-2 в нормальной человеческой сыворотке.

Анализ для измерения ингибирования образования* C3-*конвертазы лектинового пути

Функциональный анализ, позволяющий измерять ингибирование образования C3-конвертазы лектинового пути, использовали для оценки «блокирующей активности» клонов-кандидатов анти-MASP-2 scFv. Активность сериновой протеазы MASP-2 необходима для образования двух белковых компонентов (C4b, C2a), которые составляют C3-конвертазу лектинового пути. Вследствие этого, анти-MASP-2 scFv антитело, которое ингибирует функциональную активность MASP-2 (то есть, блокирующее анти-MASP-2 scFv), будет ингибировать de novo образование C3-конвертазы лектинового пути. C3 содержит необычную и высоко реакционноспособную тиоэфирную группу в своей структуре. После расщепления C3 C3-конвертазой в этом анализе, тиоэфирная группа на C3b может образовывать ковалентную связь с гидроксильными или аминогруппами на макромолекулах, иммобилизованных на дне пластиковых лунок за счет сложноэфирных или амидных связей, это облегчает обнаружение C3b в анализе ELISA.

Дрожжевой маннан является известным активатором лектинового пути. В следующем способе измерения образования C3-конвертазы пластиковые лунки, покрытые маннаном, инкубировали в течение 30 мин при 37°C с разбавленной крысиной сывороткой для активации лектинового пути. Затем лунки промывали и анализировали на C3b, иммобилизованный в лунках, стандартными методами ELISA. Количество C3b, образовавшегося в данном анализе, напрямую отражает de novo образование C3-конвертазы лектинового пути. Клоны анти-MASP-2 scFv в выбранных концентрациях тестировали в данном анализе на их способность ингибировать образование C3-конвертазы и последующее образование C3b.

Методы

45 клонов-кандидатов, идентифицированных, как описано выше, были экспрессированы, очищены и разбавлены до одной и той же концентрации маточных растворов, которые вновь разбавляли содержащим Ca^{++} и Mg^{++} буфером GVB (4,0 мМ барбитал, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ $MgCl_2$, 2,0 мМ $CaCl_2$, 0,1% желатин, pH 7,4) для гарантии того, что все клоны имеют одинаковое количество буфера. Каждый из клонов scFv тестировали в трех повторах в концентрации 2 мкг/мл. Положительным контролем служило Fab2 OMS100, которое тестировали в концентрации 0,4 мкг/мл. Образование C3c контролировали в присутствии и в отсутствие клонов scFv/IgG.

Маннан разбавляли до концентрации 20 мкг/мл (1 мкг/лунку) в 50 мМ карбонатном буфере (15 мМ Na_2CO_3+35 мМ $NaHCO_3$+1,5 мМ NaN_3), pH 9,5, и наносили для покрытия планшетов ELISA в течение ночи при 4°C. На следующий день покрытые маннаном планшеты промывали 3 раза по 200 мкл PBS. Затем в лунки добавляли по 100 мкл

блокирующего раствора 1% HSA и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали 3 раза по 200 мкл PBS и хранили на льду с 200 мкл PBS до добавления образцов.

Нормальную человеческую сыворотку разбавляли до 0,5% в буфере GVB с Ca^{++} и Mg^{++}, клоны scFv, или положительный контроль Fab2 OMS100, добавляли в трех повторах в концентрации 0,01 мкг/мл; 1 мкг/мл (только контроль OMS100) и 10 мкг/мл к этому буферу и преинкубировали 45 минут на льду перед добавлением в ELISA планшеты для анализа блокирования. Реакцию начинали путем инкубации в течение одного часа при 37°C и останавливали, перенося планшеты в ледяную баню. Отложение C3b обнаруживали при помощи антитела кролика против мышиного C3c, с последующим добавлением конъюгированных с HRP антител козы против иммуноглобулинов кролика. Отрицательным контролем служил буфер без антитела (без антитела=максимальное отложение C3b), и положительным контролем служил буфер с ЭДТА (без отложения C3b). Уровень фона определяли путем проведения того же анализа, за исключением того, что лунки не содержали маннан. Фоновый сигнал в лунках без маннана вычитали из сигналов в содержащих маннан лунках. Критерий порога отсечения был установлен на уровне половины активности постороннего клона scFv (VZV) и одного только буфера.

Результаты

На основании критерия порога отсечения всего было обнаружено 13 клонов, блокирующих активность MASP-2. Все 13 клонов, обеспечивающих подавление активности пути на уровне >50%, были выбраны и секвенированы, что привело к получению 10 уникальных клонов. Было установлено, что все десять клонов имели легкие цепи одного и того же подкласса, λ3, но тяжелые цепи трех разных подклассов: VH2, VH3 и VH6. В функциональном анализе пять из десяти клонов-кандидатов scFv имели значения IC_{50} в нМ выражении, меньшие, чем целевой критерий 25 нМ, при использовании 0,5% человеческой сыворотки.

Для получения антител с повышенной эффективностью три родительских клона scFv, идентифицированные, как описано выше, подвергали перетасовке легких цепей. Этот процесс включал получение комбинаторной библиотеки, состоящей из VH каждого из родительских клонов в паре с библиотекой нативных человеческих легких цепей лямбда (VL), полученной от трех здоровых доноров. Эту библиотеку затем подвергали скринингу на клоны scFv с улучшенной аффинностью связывания и/или функциональностью.

ТАБЛИЦА 19: СРАВНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ, ВЫРАЖЕННОЙ В IC_{50} (нМ), ВЕДУЩИХ ДОЧЕРНИХ КЛОНОВ И ИХ СООТВЕТСТВУЮЩИХ РОДИТЕЛЬСКИХ КЛОНОВ (ВСЕ В ФОРМАТЕ scFv)

Клон scFv	**1% человеческая сыворотка Анализ C3**	**90% человеческая сыворотка Анализ C3**	**90% человеческая сыворотка Анализ C4**

	(IC_{50}, нМ)	(IC_{50}, нМ)	(IC_{50}, нМ)
17D20mc	38	н/о	н/о
17D20m_d3521N11	26	>1000	140
17N16mc	68	н/о	н/о
17N16m_d17N9	48	15	230

Ниже приведены последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) для родительских клонов и дочерних клонов, указанных выше в ТАБЛИЦЕ 19**.**

Последовательности CDR по Kabat (31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-107 (H3)) выделены жирным шрифтом; и CDR по Chothia (26-32 (H1), 52-56 (H2) и 95-101 (H3)) подчеркнуты.

17D20_35VH-21N11VL, вариабельная область тяжелой цепи (VH) (SEQ ID NO: 67, закодирована SEQ ID NO: 66)

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLS**RGKMG**VSWIRQPPGKALEW**LAHIF SSDEKSYRTSL**KSRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTAT**YYCARIRRGGIDY**WGQG TLVTVSS

d17N9, вариабельная область тяжелой цепи (VH) (SEQ ID NO: 68)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVS**STSAA**WNWIRQSPSRGLEW**LGRTY YRSKWYNDYAV**SVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTA**VYYCARDPFGVPFDI**WG QGTMVTVSS

Ниже приведены последовательности вариабельной области легкой цепи (VL) для родительских клонов и дочерних клонов.

CDR по Kabat (24-34 (L1); 50-56 (L2) и 89-97 (L3)) выделены жирным шрифтом; и CDR по Chothia (24-34 (L1); 50-56 (L2) и 89-97 (L3)) подчеркнуты. Эти области являются одинаковыми при нумерации в соответствии с системой либо Kabat, либо Chothia.

17D20m_d3521N11, вариабельная область легкой цепи (VL) (SEQ ID NO: 70, закодирована SEQ ID NO: 69)

QPVLTQPPSLSVSPGQTASITCS**GEKLGDKYAYW**YQQKPGQSPVLVMYQ**DKQR PSG**IPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQ**AWDSSTAVF**GGGTKLTVL

17N16m_d17N9, вариабельная область легкой цепи (VL) (SEQ ID NO: 71)

SYELIQPPSVSVAPGQTATITCA**GDNLGKKRVHW**YQQRPGQAPVLVIYD**DSDRP SG**IPDRFSASNSGNTATLTITRGEAGDEADYYCQ**VWDIATDHV**VFGGGTKLTVLAAAG SEQKLISE

Анти-MASP-2 антитела OMS100 и моАт_d3521N11VL (содержащее вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 70, также называемое «OMS646» и «мАт H6»), оба из которых, как было продемонстрировано, связывают человеческий MASP-2 с высокой аффинностью и обладают способностью блокировать функциональную активность комплемента, анализировали в отношении связывания эпитопов в дот-блот анализе. Результаты показали, что антитела OMS646 и OMS100 являются высокоспецифичными для MASP-2 и не связывают MASP-1/3. Ни одно из антител не связывает MAp19 или фрагменты MASP-

2, которые не содержат домен CCP1 MASP-2, это позволяет заключить, что сайты связывания включают CCP1.

Анти-MASP-2 антитело OMS646, как показано, авидно связывает рекомбинантный MASP-2 (K_D 60-250 пМ) с >5000-кратной избирательностью в сравнении с C1s, C1r или MASP-1 (смотри ТАБЛИЦУ 20 ниже):

ТАБЛИЦА 20: АФФИННОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИ-MASP-2 АНТИТЕЛА OMS646 С MASP-2 ПРИ ОЦЕНКЕ В ТВЕРДОФАЗНОМ АНАЛИЗЕ ELISA

Антиген	K_D (пМ)
MASP-1	>500000
MASP-2	62±23*
MASP-3	>500000
Очищенный человеческий C1r	>500000
Очищенный человеческий C1s	~500000

*Среднее значение ± SD; n=12

OMS646 специфически блокирует лектин-зависимую активацию терминальных компонентов комплемента

Методы

Эффект OMS646 на отложение мембраноатакующего комплекса (MAC) анализировали с использованием условий, специфических для пути: для лектинового пути, классического пути и альтернативного пути. Для этой цели использовали набор для скрининга комплемента Wieslab Comp300 (Wieslab, Lund, Sweden) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты

На ФИГУРЕ 53A приведен график, показывающий уровень отложения MAC в присутствии или в отсутствие анти-MASP-2 антитела (OMS646) в условиях, специфических для лектинового пути. На ФИГУРЕ 53B приведен график, показывающий уровень отложения MAC в присутствии или в отсутствие анти-MASP-2 антитела (OMS646) в условиях, специфических для классического пути. На ФИГУРЕ 53C приведен график, показывающий уровень отложения MAC в присутствии или в отсутствие анти-MASP-2 антитела (OMS646) в условиях, специфических для альтернативного пути.

Как показано на ФИГУРЕ 53A, OMS646 блокирует активацию отложения MAC, опосредованную лектиновым путем, с величиной IC_{50} примерно 1 нМ. Однако OMS646 не оказывает влияние на отложение MAC, происходящее вследствие опосредованной классическим путем активации (ФИГУРА 53B) или опосредованной альтернативным путем активации (ФИГУРА 53C).

Фармакокинетика и фармакодинамика OMS646 после внутривенного (в/в) или подкожного (п/к) введения мышам

Фармакокинетику (ФК) и фармакодинамику (ФД) OMS646 оценивали в 28-

дневном исследовании ФК/ФД на мышах с однократным введением дозы. В исследовании тестировали уровни дозы 5 мг/кг и 15 мг/кг OMS646 при подкожном (п/к) введении, а также уровень дозы 5 мг/кг OMS646 при внутривенном (в/в) введении.

Что касается ФК профиля OMS646, на ФИГУРЕ 54 приведен график, показывающий концентрацию OMS646 (среднее для n=3 животных/группах) в зависимости от времени после введения OMS646 в указанной дозе. Как показано на ФИГУРЕ 54, при п/к дозе 5 мг/кг OMS646 достигало максимальной концентрации в плазме 5-6 мкг/мл примерно через 1-2 дня после дозирования. Биодоступность OMS646 при п/к дозе 5 мг/кг составляла примерно 60%. Как также показано на ФИГУРЕ 54, при п/к дозе 15 мг/кг OMS646 достигало максимальной концентрации в плазме 10-12 мкг/мл через примерно 1-2 дня после дозирования. Во всех группах OMS646 медленно выводилось из системы кровообращения с конечным периодом полувыведения примерно 8-10 дней. Профиль OMS646 является типичным для человеческих антител в организме мыши.

ФД активность OMS646 графически представлена на ФИГУРАХ 55A и 55B. На ФИГУРАХ 55A и 55B показан ФД ответ (падение системной активности лектинового пути) для каждой мыши в группах в/в дозы 5 мг/кг (ФИГУРА 55A) и п/к дозы 5 мг/кг (ФИГУРА 55B). Пунктирная линия показывает базовый уровень в анализе (максимальное ингибирование; нормальная мышиная сыворотка с добавленным in vitro перед анализом избытком OMS646). Как показано на ФИГУРЕ 55A, после в/в введения дозы 5 мг/кг OMS646 системная активность лектинового пути немедленно падала до почти не поддающихся определению уровней, и активность лектинового пути демонстрировала лишь умеренное восстановление в течение 28-дневного периода наблюдения. Как показано на ФИГУРЕ 55B, у мышей, получавших п/к дозу 5 мг/кг OMS646, наблюдалось зависимое от времени ингибирование активности лектинового пути. Активность лектинового пути падала до почти не поддающихся определению уровней в пределах 24 часов после введения лекарственного средства и оставалась на низких уровнях в течение по меньшей мере 7 дней. Активность лектинового пути постепенно увеличивалась со временем, но не возвращалась к уровням до введения дозы в течение 28-дневного периода наблюдения. Профиль зависимости активности лектинового пути от времени, наблюдаемый после введения п/к дозы 15 мг/кг, был аналогичен таковому после введения п/к дозы 5 мг/кг (данные не представлены), это указывало на насыщение ФД конечной точки. Данные также указывали на то, что еженедельная доза 5 мг/кг OMS646, вводимая либо в/в, либо п/к, является достаточной для достижения непрерывного подавления системной активности лектинового пути у мышей.

Пример 41

В данном примере показано, что ингибирующее MASP-2 антитело (OMS646) ингибирует индуцируемое aHUS сывороткой отложение C5b-9 комплемента на поверхности активированных человеческих микроваскулярных эндотелиальных клеток (HMEC-1) после воздействия сыворотки от пациентов с атипичным гемолитическим

уремическим синдромом (aHUS), полученной во время острой фазы и фазы ремиссии заболевания.

Предпосылки/обоснование

Проводили следующее исследование для анализа индуцируемого aHUS сывороткой отложения C5b-9 комплемента на поверхности активированных клеток HMEC-1 после воздействия сыворотки пациентов с aHUS, полученной (1) во время острой фазы и (2) во время фазы ремиссии заболевания, в присутствии или в отсутствие OMS646, анти-MASP-2 антитела, которое специфически связывает MASP-2 и ингибирует активацию лектинового пути.

Методы

Пациенты

Четыре пациента с aHUS, изученные как во время острой фазы заболевания, так и во время ремиссии, были выбраны для данного исследования из числа людей, включенных в Международный реестр HUS/TTP, и генотипированы в лаборатории иммунологии и генетики Института трансплантации и редких болезней им. Марио Негри. Один пациент с aHUS имел гетерозиготную мутацию p.R1210C фактора H комплемента (CFH) и один имел анти-CFH аутоантитела, в то время как у других двух пациентов с aHUS мутации или антитела к CFH не были обнаружены.

В ТАБЛИЦАХ 21 и 22 суммированы результаты скрининга на мутации генов компонентов комплемента и анти-CFH аутоантитела у четырех пациентов с aHUS, проанализированных в данном исследовании, наряду с клиническими и биохимическими данными, полученными либо во время острой фазы, либо во время ремиссии.

ТАБЛИЦА 21: КЛИНИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЧЕТЫРЕХ ПАЦИЕНТОВ С aHUS В ДАННОМ ИССЛЕДОВАНИИ

Пациент	Мутация или анти-CFH Ат	Фаза заболевания	Тромбоциты (150-400*10^3/мкл)	LDH (266-500 МЕ/л)	Гемоглобин (14-18 г/дл)	с-креатинин (0,55-1,25 мг/дл)
№1	без мутаций, без анти-CFH Ат	острая	31000	1396	12,9	2,37
		ремиссия	267000	н/о	11,5	3,76
№2	CFH-R1210C	острая	46000	1962	7	5,7
		ремиссия	268000	440	13,4	7,24
№3	анти-CFH Ат	острая	40000	3362	9,5	1,77
		ремиссия	271000	338	8,8	0,84
	без мутаций,	острая	83000	1219	7,8	6,8

№4	без анти-CFH Ат					
		ремиссия	222000	495	12,2	13

Примечание: н/о=не определено

ТАБЛИЦА 22: ПАРАМЕТРЫ КОМПЛЕМЕНТА У ЧЕТЫРЕХ ПАЦИЕНТОВ С aHUS В ДАННОМ ИССЛЕДОВАНИИ

Пациент	Мутация или анти-CFH Ат	Фаза заболевания	C3 в сыворотке (83-180 мг/дл)	SC5b-9 в плазме (127-400 нг/мл)
№1	без мутаций, без анти-CFH Ат	острая	51	69
		ремиссия	н/о	117
№2	CFH-R1210C	острая	79	421
		ремиссия	119	233
№3	анти-CFH Ат	острая	58	653
		ремиссия	149	591
№4	без мутаций, без анти-CFH Ат	острая	108	н/о
		ремиссия	н/о	н/о

Экспериментальные методы

Клетки клеточной линии человеческого микроваскулярного эндотелия (HMEC-1), полученной из кожи, высевали на стеклянные слайды и использовали в состоянии конфлюэнтности. Конфлюэнтные клетки HMEC-1 активировали 10 мкМ АДФ (аденозиндифосфат) в течение 10 минут, а затем инкубировали в течение четырех часов с сывороткой от четырех пациентов с aHUS, описанных выше в ТАБЛИЦАХ 23 и 24, собранной либо во время острой фазы заболевания, либо от тех же пациентов с aHUS во время ремиссии, или от 4 здоровых контрольных субъектов. Сыворотку разбавляли 1:2 аналитической средой (HBSS с 0,5% BSA) в присутствии или в отсутствие ингибирующего MASP-2 антитела, OMS646 (100 мкг/мл), полученного, как описано выше в примере 40, или в присутствии растворимого рецептора 1 комплемента (sCR1) (150 мкг/мл), в качестве положительного контроля ингибирования комплемента. После завершения этапа инкубации клетки HMEC-1 обрабатывали кроличьим антителом против человеческого C5b-9 комплемента, а затем FITC-конъюгированным вторичным антителом. В каждом эксперименте тестировали сыворотку от одного здорового контрольного субъекта параллельно с сывороткой пациента с aHUS (в острой фазе и в ремиссии). Использовали конфокальный инвертированный лазерный микроскоп для получения изображений флуоресцентного окрашивания на поверхности эндотелиальных клеток. Получали изображения пятнадцати полей для каждого образца, площадь флуоресцентного окрашивания оценивали путем автоматизированного распознавания контуров изображения с использованием встроенных специальных функций программы Image J и выражали в виде количества пикселей^2 на каждое анализируемое поле. Поля с

самыми низкими и самыми высокими значениями исключали из расчетов.

Для статистического анализа (односторонний анализ ANOVA, с последующим критерием Туки для множественных сравнений) результаты в пикселях^2 13 полей рассматривали в каждом экспериментальном состоянии для каждого пациента, и также использовали контроли.

Результаты

Результаты анализа отложения комплемента с использованием сывороток от четырех пациентов с aHUS приведены ниже в ТАБЛИЦЕ 23A, и результаты с сывороткой от четырех здоровых субъектов приведены ниже в ТАБЛИЦЕ 23B.

ТАБЛИЦА 23A: ЭФФЕКТ ИНГИБИТОРОВ КОМПЛЕМЕНТА НА ИНДУЦИРОВАННОЕ aHUS СЫВОРОТКОЙ ОТЛОЖЕНИЕ C5b-9 НА АДФ-АКТИВИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ HMEC-1

Пациент с aHUS №	**Острая фаза aHUS**			**Фаза ремиссии aHUS**		
	без обработки	+sCR1	+OMS646	без обработки	+sCR1	+OMS646
Пациент №1 (без мутаций, без анти-CFH Ат)	5076 ± 562°	551 ± 80*	3312 ± 422**	4507 ± 533°	598 ± 101§	1650 ± 223§
Пациент №2 (CFH-R1210C)	5103 ± 648°	497 ± 67*	2435 ± 394*	3705 ± 570°	420 ± 65§	2151 ± 250§§§
Пациент №3 (анти-CFH Ат)	3322 ± 421°	353 ± 64*	2582 ± 479	6790 ± 901°	660 ± 83§	2077 ± 353§
Пациент №4 (без мутаций, без анти-CFH Ат)	4267 ± 488°	205 ± 34*	2369 ± 265**	5032 ± 594°	182 ± 29§	3290 ± 552§§

ТАБЛИЦА 23В: ЭФФЕКТ ИНГИБИТОРОВ КОМПЛЕМЕНТА НА СЫВОРОТКУ ОТ ЧЕТЫРЕХ ЗДОРОВЫХ КОНТРОЛЬНЫХ СУБЪЕКТОВ (НЕ СТРАДАЮЩИХ ОТ aHUS) В АНАЛИЗЕ НА ОТЛОЖЕНИЕ C5b-9 НА АДФ-АКТИВИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ HMEC-1

Здоровый контрольный субъект №	**Без обработки**	**+sCR1**	**+OMS646**
Контрольный субъект №1 (анализ параллельно с субъектом №1 с aHUS)	481 ± 66	375 ± 43	213 ± 57
Контрольный субъект №2 (анализ параллельно с субъектом №2 с aHUS)	651 ± 61	240 ± 33	490 ± 69
Контрольный субъект №3 (анализ параллельно с субъектом №3 с aHUS)	602 ± 83	234 ± 35	717 ± 109
Контрольный субъект №4 (анализ параллельно с субъектом №4 с aHUS)	370 ± 53	144 ± 20	313 ± 36

Для ТАБЛИЦ 23А и 23В: данные представляют собой средние значения ± SE. °P<0,001 против контроля; *P<0,001, **P<0,01 против aHUS в острой фазе, без обработки; §P<0,001, §§P<0,01, §§§P<0,05 против aHUS в фазе ремиссии, без обработки.

На ФИГУРЕ 56 приведен график, показывающий ингибирующий эффект анти-MASP-2 антитела (OMS646) и sCR1 на индуцированное aHUS сывороткой отложение C5b-9 на АДФ-активированных клетках HMEC-1. На ФИГУРЕ 56 данные представляют собой средние значения ± SE. °P<0,0001 против контроля; *P<0,0001 против aHUS в острой фазе, без обработки; ^P<0,0001 против aHUS в острой фазе+sCR1; §P<0,0001 против aHUS в фазе ремиссии, без обработки и #P<0,0001 против aHUS в фазе ремиссии+sCR1.

Как показано в ТАБЛИЦЕ 23А, 23В и на ФИГУРЕ 56, АДФ-стимулированные клетки HMEC-1, подвергнутые воздействию сыворотки от пациентов с aHUS (собранной либо в острой фазе, либо в фазе ремиссии) в течение четырех часов в статических условиях, имели крупные отложения C5b-9 на клеточной поверхности, обнаруженные методом конфокальной микроскопии. При измерении площади, покрытой C5b-9, значительно большую степень отложения C5b-9 наблюдали на клетках, подвергнутых воздействию сыворотки от пациентов с aHUS, чем на клетках, подвергнутых воздействию сыворотки от здоровых контрольных субъектов, независимо от того, была ли aHUS сыворотка собрана в острой фазе или во время ремиссии. Какие-либо отличия в индуцированном сывороткой отложении C5b-9 на эндотелии отсутствовали между острой

фазой и ремиссией.

Как также показано в ТАБЛИЦЕ 23A, 23B и на ФИГУРЕ 56, добавление анти-MASP-2 антитела OMS646 к aHUS сыворотке (полученной от пациентов либо в острой фазе, либо во время ремиссии) приводило к значительному уменьшению отложения C5b-9 на поверхности эндотелиальных клеток в сравнении с необработанной aHUS сывороткой. Однако ингибирующий эффект OMS646 на отложение C5b-9 был менее выражен, чем эффект, производимый пан-ингибитором комплемента sCR1. Действительно, статистически значимое отличие наблюдали между индуцированным aHUS сывороткой отложением C5b-9 в присутствии OMS646 в сравнении с sCR1 (ФИГУРА 56 и ТАБЛИЦЫ 23A и 23B).

При расчете среднего значения для четырех пациентов с aHUS наблюдали следующее процентное уменьшение отложения C5b-9 (в сравнении с отложением C5b-9, индуцированным необработанной сывороткой от тех же пациентов, принятым за 100%) в присутствии ингибиторов комплемента:

Острая фаза:

sCR1 (150 мкг/мл): уменьшение на 91% отложения C5b-9

OMS646 (100 мкг/мл): уменьшение на 40% отложения C5b-9

Фаза ремиссии:

sCR1 (150 мкг/мл): уменьшение на 91% отложения C5b-9

OMS646 (100 мкг/мл): уменьшение на 54% отложения C5b-9

Вывод

Результаты, описанные в данном примере, демонстрируют, что лектиновый путь комплемента стимулируется активированными микроваскулярными эндотелиальными клетками, и что эта стимуляция является важным фактором для избыточной активации комплемента, характерной для aHUS. Также было показано, что эта стимуляция лектинового пути и, как следствие, избыточная активация комплемента происходит как во время острой фазы, так и во время клинической ремиссии aHUS. Более того, этот результат, судя по всему, не ограничен каким-либо конкретным дефектом комплемента, связанным с aHUS. Как также продемонстрировано в этом примере, избирательное ингибирование лектинового пути ингибирующим MASP-2 антителом, таким как OMS646, приводит к уменьшению отложения комплемента у пациентов с aHUS разной этиологии.

Пример 42

В данном примере показано, что ингибирующее MASP-2 антитело (OMS646) ингибирует индуцированную aHUS сывороткой агрегацию тромбоцитов и образование тромбов на поверхности активированных человеческих микроваскулярных эндотелиальных клеток (HMEC-1) после воздействия сыворотки пациентов с aHUS, полученной во время (1) острой фазы и (2) фазы ремиссии aHUS.

Методы

Пациенты

Три пациента (пациенты №1, №2 и №4, описанные в ТАБЛИЦАХ 21, 22, 23A и 23B

в примере 41) с aHUS (один пациент имел гетерозиготную мутацию p.R1210C CFH, в то время как мутации или анти-CFH антитела не были обнаружены у других двух пациентов) были изучены как во время острой фазы заболевания, так и во время ремиссии. Пациенты были выбраны для данного исследования из числа людей, включенных в Международный реестр HUS/TTP, и генотипированы в лаборатории иммунологии и генетики Института трансплантации и редких болезней им. Марио Негри. Пять здоровых субъектов также были выбраны в качестве доноров крови для экспериментов с перфузией.

Методы

Конфлюэнтные клетки HMEC-1 активировали 10 мкМ АДФ в течение 10 минут, а затем инкубировали в течение трех часов с сывороткой от трех пациентов с aHUS (пациенты №1, 2 и 4, описанные в примере 41), собранной во время острой фазы заболевания, или от тех же пациентов в фазе ремиссии, или с контрольной сывороткой от здоровых субъектов. Сыворотку разбавляли 1:2 аналитической средой (HBSS с 0,5% BSA) в присутствии или в отсутствие ингибирующего MASP-2 антитела, OMS646 (100 мкг/мл), полученного, как описано выше в примере 40, или в присутствии sCR1 (150 мкг/мл) в качестве положительного контроля ингибирования комплемента. В случае пациентов №1 и №2 дополнительные лунки инкубировали с сывороткой (полученной в острой фазе и во время ремиссии), разбавленной 1:2 аналитической средой, содержащей 100 мкг/мл постороннего контрольного по изотипу антитела или 20 мкг/мл OMS646 (для последнего тестировали сыворотку пациента №1, полученную только в фазе ремиссии, и тестировали сыворотку пациента №2, полученную как во время острой фазы, так и в фазе ремиссии).

После завершения этапа инкубации проводили перфузию клеток HMEC-1 в проточной камере гепаринизированной цельной кровью (10 МЕ/мл), полученной от здоровых субъектов (содержащей флуоресцентный краситель акрихин, который метит тромбоциты) при напряжении сдвига, имеющем место в микроциркуляции (60 дин/см^2, три минуты). После трех минут перфузии, монослои эндотелиальных клеток фиксировали в ацетоне. Пятнадцать изображений для каждого образца тромбоцитарных тромбов на поверхности эндотелиальных клеток получали при помощи конфокального инвертированного лазерного микроскопа, и площади, занятые тромбами, оценивали с использованием программы Image J. Поля с самыми низкими и самыми высокими значениями исключали из расчетов.

Для статистического анализа (односторонний анализ ANOVA, с последующим критерием Туки для множественных сравнений) результаты в пикселях^2 13 полей рассматривали в каждом экспериментальном состоянии для каждого пациента, и также использовали контроли.

Результаты

Результаты экспериментов по образованию тромбов с сывороткой от трех пациентов с aHUS приведены ниже в ТАБЛИЦЕ 24A, и результаты с сывороткой от пяти здоровых субъектов приведены ниже в ТАБЛИЦЕ 24B.

ТАБЛИЦА 24A: ЭФФЕКТ ИНГИБИТОРОВ КОМПЛЕМЕНТА НА

ИНДУЦИРОВАННОЕ aHUS СЫВОРОТКОЙ ОБРАЗОВАНИЕ ТРОМБОВ (ПИКСЕЛИ^2 ± SE) НА АДФ-АКТИВИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ HMEC-1

Экспериментальные условия	**Фаза заболевания**	**Пациент с aHUS №1** образование тромбов (пиксели^2 ± SE) (без мутаций, без анти-CFH Ат)	**Пациент с aHUS №2** образование тромбов (пиксели^2 ± SE) (CFH-R1210C)	**Пациент с aHUS №4** образование тромбов (пиксели^2 ± SE) (без мутаций, без анти-CFH Ат)
Без обработки	острая	5499 ± 600	22320 ± 1273°	10291 ± 1362°
	ремиссия	6468 ± 1012°	3387 ± 443°	17676 ± 1106°
+sCR1 (150 мкг/мл)	острая	4311 ± 676	5539 ± 578*	5336 ± 1214***
	ремиссия	573 ± 316§	977 ± 102§	2544 ± 498§
+OMS646 (20 мкг/мл)	острая	не определено	6974 ± 556*	не определено
	ремиссия	832 ± 150§	1224 ± 252§	не определено
+OMS646 (100 мкг/мл)	острая	3705 ± 777	9913 ± 984*	2836 ±509*
	ремиссия	3321 ± 945§§§	733 ± 102§	1700 ± 321§
+ постороннее контрольное по изотипу антитело (100 мкг/мл)	острая	5995 ± 725	18655 ± 1699	не определено
	ремиссия	10885 ± 1380	2711 ± 371	не определено

ТАБЛИЦА 24B: ЭФФЕКТ ИНГИБИТОРОВ КОМПЛЕМЕНТА НА СЫВОРОТКУ ОТ ПЯТИ ЗДОРОВЫХ КОНТРОЛЬНЫХ СУБЪЕКТОВ (НЕ СТРАДАЮЩИХ ОТ aHUS) В АНАЛИЗЕ НА ОБРАЗОВАНИЕ ТРОМБОВ (ПИКСЕЛИ^2 ± SE) НА АДФ-АКТИВИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ HMEC-1

Экспериментальные условия	**Контроль №1** образование тромбов (пиксели^2 ± SE)	**Контроль №2** образование тромбов (пиксели^2 ± SE)	**Контроль №3** образование тромбов (пиксели^2 ± SE)	**Контроль №4** образование тромбов (пиксели^2 ± SE)	**Контроль №5** образование тромбов (пиксели^2 ± SE)

Без обработки	2880 ± 510	1046 ± 172	1144 ± 193	735 ± 124	2811 ± 609
+sCR1 (150 мкг/мл)	5192 ± 637	1527 ± 153	1198 ± 138	2239 ± 243	2384 ± 410
+OMS646 (100 мкг/мл)	7637 ± 888	1036 ± 175	731 ± 203	2000 ± 356	7177 ± 1477
+ постороннее контрольное по изотипу антитело (100 мкг/мл	6325 ± 697	1024 ± 235	399 ± 82	45269	не определено
Анализировано параллельно с сывороткой от субъекта с aHUS	№1 (сыворотка острой фазы)	№1 (сыворотка фазы ремиссии)	№2 (сыворотка острой фазы)	№2 (сыворотка фазы ремиссии)	№5 (сыворотка острой фазы и фазы ремиссии)

Для ТАБЛИЦ 24A и 24B: данные представляют собой средние значения ± SE. °P<0,001 против контроля; *P<0,001, ***P<0,05 против aHUS в острой фазе, без обработки; §P<0,001, §§§P<0,05 против aHUS в фазе ремиссии, без обработки.

На ФИГУРЕ 57 приведен график, показывающий эффект анти-MASP-2 антитела (OMS646) и sCR1 на индуцированное aHUS сывороткой образование тромбов на АДФ-активированных клетках HMEC-1. На ФИГУРЕ 57 данные представляют собой средние значения ± SE. °P<0,0001, °°P<0,01 против контроля; *P<0,0001, **P<0,01 против aHUS в острой фазе, без обработки; §P<0,0001 против aHUS в фазе ремиссии, без обработки.

Как показано в ТАБЛИЦЕ 24A и на ФИГУРЕ 57, заметное увеличение площади, покрытой тромбами, наблюдалось на клетках HMEC-1, обработанных aHUS сывороткой, собранной либо в острой фазе, либо в фазе ремиссии, в сравнении с клетками, подвергнутыми воздействию сыворотки от здоровых контрольных субъектов (ТАБЛИЦА 24B и ФИГУРА 57). Как показано на ФИГУРЕ 57 и в ТАБЛИЦЕ 24A, OMS646 (в обеих концентрациях, 100 мкг/мл и 20 мкг/мл) приводило к частичному ингибированию образования тромбов на клетках, предварительно подвергнутых воздействию aHUS

сыворотки, полученной во время острой фазы. Антитромбогенный эффект был сопоставим при использовании двух разных доз OMS646 и не отличался от эффекта sCR1 (ФИГУРА 57 и ТАБЛИЦА 24А). Добавление постороннего контрольного по изотипу антитела не приводило к ингибированию индуцированного aHUS сывороткой образования тромбов.

Как также показано на ФИГУРЕ 57 и в ТАБЛИЦЕ 24А, ингибирующий эффект OMS646 был еще более очевидным в случае aHUS сыворотки, собранной во время фазы ремиссии. Действительно, добавление OMS646, в обеих дозах, 100 мкг/мл и 20 мкг/мл, к сыворотке пациента с aHUS, собранной во время ремиссии, приводило к почти полному ингибированию образования тромбов, аналогично тому, что наблюдалось при добавлении sCR1. Постороннее контрольное по изотипу антитело не оказывало существенного ингибирующего эффекта.

При расчете среднего значения для трех пациентов с aHUS наблюдали следующее процентное уменьшение поверхности HMEC-1, покрытой отложением тромбов (в сравнении с площадью тромбов, индуцированной необработанной сывороткой от тех же пациентов, принятой за 100%), в присутствии ингибиторов комплемента:

Острая фаза:

sCR1 (150 мкг/мл): уменьшение на 60%

OMS646 (100 мкг/мл): уменьшение на 57%

OMS646 (20 мкг/мл): уменьшение на 45%

Фаза ремиссии:

sCR1 (150 мкг/мл): уменьшение на 85%

OMS646 (100 мкг/мл): уменьшение на 79%

OMS646 (20 мкг/мл): уменьшение на 89%

Обсуждение результатов

Результаты в данном примере показывают, что ингибирующее MASP-2 антитело, такое как OMS646 (полученное, как описано в примере 40), оказывает сильный ингибирующий эффект на индуцированное aHUS сывороткой образование тромбов на клетках HMEC-1. Удивительно, но ингибирующий эффект OMS646 на образование тромбов был больше, чем его эффект на индуцированное отложение C5b-9 на клетках HMEC-1 (как описано в примере 41). Также удивительно, что добавление OMS646, в обеих дозах, 100 мкг/мл и 20 мкг/мл, к сыворотке пациентов с aHUS, собранной во время фазы ремиссии, приводило к почти полному ингибированию образования тромбов. Также удивительным является то наблюдение, что OMS646, как в случае острой фазы, так и в случае ремиссии, было так же эффективно, как положительный контроль sCR1, который является общим и почти абсолютным ингибитором системы комплемента (Weisman H. et al., Science 249:146-151, 1990; Lazar H. et al., Circulation 100:1438-1442, 1999).

Следует отметить, что контрольная сыворотка от здоровых субъектов также индуцировала умеренное образование тромбов на клетках HMEC-1. Авторы изобретения не наблюдали соответствующий ингибирующий эффект на индуцированное контрольной

сывороткой образование тромбов при использовании либо OMS646, либо sCR1. Без связи с конкретной теорией, считается, что индуцированные контрольной сывороткой тромбы не зависят от комплемента, на что указывает очень низкое количество отложений C5b-9, наблюдаемое на клетках HMEC-1, инкубированных с контрольной сывороткой (смотри пример 41).

Вывод

Подводя итог, наблюдаемый антитромботический эффект ингибирующего MASP-2 антитела, такого как OMS646, судя по всему, является гораздо более сильным, чем можно было бы ожидать, исходя из ингибирующего эффекта OMS646 на отложение C5b-9, наблюдаемое в данной экспериментальной системе (как описано в примере 41 и показано на ФИГУРЕ 56). Например, как описано в публикации Gastoldi et al., Immunobiology 217:1129-1222 Abstract 48 (2012), озаглавленной «C5a/C5aR interaction mediates complement activation and thrombosis on endothelial cells in atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS)», было установлено, что добавление анти-C5 антитела, ингибирующего отложение C5b-9 (уменьшение 60%), ограничивало образование тромбов на HMEC-1 в сопоставимой степени (уменьшение 60%). Напротив, ингибирующее MASP-2 антитело (OMS646 в концентрации 100 мкг/мл) ингибировало отложение C5b-9 со следующими средними показателями (острая фаза=уменьшение 40%; фаза ремиссии=уменьшение 54%); и ингибировало образование тромбов в значительно более высокой степени (острая фаза=уменьшение 57%; фаза ремиссии=уменьшение 79%). Для сравнения, OMS646 ингибировало отложение комплемента в меньшей степени, в процентном выражении, чем положительный контроль - ингибитор комплемента (sCR1 в концентрации 150 мкг/мл, ингибирование отложения C5b-9 в случае острой фазы=уменьшение 91%; в случае фазы ремиссии=уменьшение 91%), но было эффективным в равной с положительным контролем sCR1 степени при ингибировании образования тромбов (sCR1 в концентрации 150 мкг/мл, в случае острой фазы=уменьшение 60%; случае фазы ремиссии=уменьшение 85%). Эти результаты показывают, что ингибирующее MASP-2 антитело (например, OMS646) является на удивление эффективным в ингибировании образования тромбов в сыворотке, полученной от субъектов с aHUS, как в острой фазе, так и в фазе ремиссии заболевания.

В соответствии с вышеизложенным, в одном варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования образования тромбов у субъекта, страдающего от, или имеющего риск развития, тромботической микроангиопатии (TMA), включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления TMA выбирают из группы, состоящей из гемолитического уремического синдрома (HUS), тромботической тромбоцитопенической пурпуры (TTP) и атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS). В одном варианте осуществления TMA представляет собой aHUS. В одном варианте осуществления композицию вводят пациенту с aHUS во время острой фазы заболевания.

В одном варианте осуществления композицию вводят пациенту с aHUS во время фазы ремиссии (то есть, субъекту, который восстановился, или частично восстановился, после эпизода острой фазы aHUS, при этом на ремиссию указывает, например, повышение количества тромбоцитов и/или снижение сывороточных концентраций LDH, например, как описано в публикации Loirat C et al., Orphanet Journal of Rare Diseases 6:60, 2011, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки).

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело имеет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческий MASP-2 с величиной K_D, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в домене CCP1 MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в in vitro анализе в 1% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее, при этом антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', $F(ab)_2$ и $F(ab')_2$, при этом антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG2, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, при этом молекула IgG4 имеет мутацию S228P и/или при этом антитело существенно не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не ингибирует альтернативный путь. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не ингибирует классический путь или альтернативный путь (то есть, ингибирует лектиновый путь, при этом не затрагивая классический и альтернативный пути комплемента).

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке субъекта, страдающего от TTP, такой как aHUS (в острой фазе или в фазе ремиссии), на по меньшей мере 30%, например, по меньшей мере 40%, например, по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80% например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, вплоть до 99%, в сравнении с необработанной сывороткой. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке субъекта, страдающего от aHUS, на уровне, по меньшей мере на 20 процентов, или более (например, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%) превышающем ингибирующий эффект на отложение C5b-9 в сыворотке.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке от пациента с aHUS в фазе ремиссии на по меньшей мере 30%, например, по меньшей мере 40%, например, по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80% например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей

мере 95%, вплоть до 99%, в сравнении с необработанной сывороткой. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке от пациента с aHUS в фазе ремиссии на уровне, по меньшей мере на 20 процентов, или более (например, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%) превышающем ингибирующий эффект на отложение C5b-9 в сыворотке.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту способом доставки через внутривенный катетер или другой катетер.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования образования тромбов у субъекта, страдающего от a TMA, включающему введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего (I) (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: i) CDR-H1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 31-35 в SEQ ID NO: 67; и ii) CDR-H2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-65 в SEQ ID NO: 67; и iii) CDR-H3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 95-102 в SEQ ID NO: 67, и b) вариабельную область легкой цепи, содержащую: i) CDR-L1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 24-34 в SEQ ID NO: 70; и ii) CDR-L2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-56 в SEQ ID NO: 70; и iii) CDR-L3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 89-97 в SEQ ID NO: 70, или (II) его варианта, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67) и вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 70.

В одном варианте осуществления TMA выбирают из группы, состоящей из атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS) (в острой фазе или в фазе ремиссии), HUS и TTP. В одном варианте осуществления субъект имеет aHUS в острой фазе. В одном варианте осуществления субъект имеет aHUS в фазе ремиссии.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей

определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически узнает по меньшей мере часть эпитопа на человеческом MASP-2, узнаваемого эталонным антителом OMS646, содержащим вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 70. Конкуренцию между партнерами по связыванию можно с легкостью анализировать in vitro, например, методом ELISA и/или путем присоединения к одному партнеру по связыванию репортерной молекулы, которую можно обнаруживать в присутствии другого не маркированного партнера(ов) по связыванию, что позволяет идентифицировать конкретных партнеров по связыванию, связывающих один и тот же эпитоп или перекрывающийся эпитоп. Таким образом, в настоящем документе предложено специфическое антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее антигенсвязывающий сайт человеческого антитела, которое конкурирует с эталонным антителом OMS646 за связывание с человеческим MASP-2.

Пример 43

В данном примере показано, что человеческое ингибирующее MASP-2 антитело (OMS646) способно ингибировать опосредованную плазмой пациента с TMA индукцию апоптоза в первичных человеческих микроваскулярных эндотелиальных клетках (MVEC), полученных из кожи.

Предпосылки/обоснование

Известно, что патофизиология TMA включает повреждение эндотелиальных клеток, индуцированное различными факторами, за которым следует окклюзия мелких сосудов (например, мелких артериолей и капилляров) пробками из тромбоцитов и/или фибриновыми тромбами (Hirt-Minkowsk P. et al., Nephron Clin Pract 114:c219-c235, 2010; Goldberg R.J. et al., Am J Kidney Dis 56(6):1168-1174, 2010). Показано, что MVEC подвергаются апоптотическому повреждению in vitro под воздействием плазмы от пациентов с TMA-связанными заболеваниями (смотри Stefanescu et al., Blood Vol 112 (2):340-349, 2008; Mitra D. et al., Blood 89:1224-1234, 1997). Апоптотические повреждения, связанные с TMA, были задокументированы в MVEC, полученных из биопсийных образцов тканей (кожи, кости, костного мозга, селезенки, почки, подвздошной кишки) таких пациентов. Также показано, что апоптотические повреждения MVEC приводят к снижению уровней мембраносвязанных регуляторных белков комплемента в MVEC (смотри, например, Mold & Morris, Immunology 102:359-364, 2001; Christmas et al., Immunology 119:522, 2006).

Считается, что цикл положительной обратной связи с участием терминальных компонентов комплемента вовлечен в патофизиологию TMA, включая атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS) и TMA, связанные с катастрофическим

антифосфолипидным синдромом (CAPS), болезнью Дегоса, а также TMA вследствие рака, противораковой химиотерапии, аутоиммунитета и трансплантации, каждое из этих состояний, как известно или считается, отвечает на анти-C5 терапию с использованием мАт экулизумаба (Chapin J. et al., Brit. J. Hematol 157:772-774, 2012; Tsai et al., Br J Haematol 162(4):558-559, 2013); Magro C. M. et al., Journal of Rare Diseases 8:185, 2013).

Проводили следующий эксперимент для анализа способности человеческого ингибирующего MASP-2 антитела (OMS646) блокировать опосредованную плазмой пациента с TMA индукцию апоптоза в первичных человеческих кожных MVEC в образцах плазмы, полученных от пациентов, страдающих от aHUS, связанной с дефицитом ADAMTS-13 тромботической тромбоцитопенической пурпуры (TTP), CAPS и системной болезни Дегоса, а также TMA вследствие рака, трансплантации, аутоиммунного заболевания и химиотерапии.

Методы

Проводили in vitro тест для анализа способности ингибирующего MASP-2 антитела (OMS646) блокировать опосредованную плазмой пациента с TMA индукцию апоптоза в первичных человеческих MVEC из кожи, как описано в публикации Stefanescu R. et al., Blood Vol 112 (2):340-349, 2008, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Образцы плазмы, используемые в данном анализе, были получены из коллекции образцов от здоровых контрольных субъектов и от индивидуумов с тромботическими микроангиопатиями либо в острой фазе, либо в период выздоровления. Наличие микроангиопатии у пациентов с TMA оценивали путем обнаружения шизоцитов в мазке периферической крови. Кроме того, TTP была диагностирована, как описано в публикации Stefanescu R. et al., Blood Vol 112 (2):340-349, 2008.

Культура эндотелиальных клеток (EC)

Как описано в Stefanescu et al., первичные человеческие MVEC из кожи приобретали у компании ScienCell Research Labs (San Diego, CA). MVEC экспрессировали CD34 вплоть до 5 и 6 пересевов (Blood 89:1224-1234, 1997). MVEC поддерживали в полистирольных флаконах, покрытых 0,1% раствором желатина в воде, в среде ECM1001 (ScienCell Research Labs), содержащей добавки для роста эндотелиальных клеток, пенициллин, стрептомицин и 15% эмбриональной бычьей сыворотки. Все MVEC использовали на стадии 2-6 пересева. Субкультивирование включало обработку в течение 5-10 минут 0,25% раствором трипсин-ЭДТА.

Анализ апоптоза

Репрезентативные первичные человеческие MVEC из кожи, которые, как известно, подвержены индуцированному TTP/HUS плазмой апоптозу, промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и высевали в камеры 12-луночных планшетов, покрытых 0,1% раствором желатина в воде, в концентрации $0{,}15\times10^6$ жизнеспособных клеток/мл. Высеянные клетки MVEC оставляли без подкормки в полной среде на 24 часа, затем подвергали воздействию образцов плазмы пациентов с TMA, или плазмы здоровых доноров, в разных концентрациях (от 2% до 20%, об/об) в течение 18 часов в присутствии

или в отсутствие анти-MASP-2 мАт OMS646 (150 мкг/мл), затем клетки собирали путем обработки трипсином. Каждый образец от пациента с ТМА анализировали в двух повторах. Степень опосредованного плазмой апоптоза оценивали с использованием окрашивания пропидия иодидом (PI); $>5\times10^3$ клеток анализировали в цитофлюорографе, и пики A0 определяли при помощи компьютерной программы (MCycle Av, Phoenix Flow Systems, San Diego, CA). Также проводили количественное определение связанных с цитоплазматическими гистонами фрагментов ДНК из клеточных лизатов методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в соответствии с инструкциями производителя (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Результаты

Результаты анализа апоптоза MVEC, индуцированного плазмой пациентов с ТМА, в присутствии анти-MASP-2 мАт (OMS646) приведены ниже в ТАБЛИЦЕ 25.

ТАБЛИЦА 25: ПЛАЗМА ПАЦИЕНТОВ С ТМА, ПРОТЕСТИРОВАННАЯ НА ПЕРВИЧНЫХ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КОЖНЫХ MVEC В ПРИСУТСТВИИ АНТИ-MASP-2 МАТ (OMS646)

Субъект №	Возраст/пол	Клинический диагноз (ТМА) и другие состояния	MASP-2 нг/мл	Диагноз на основании Cre/LDH	C5a	sC5-b9	Активность ADAMS	Диагноз на основании активности ADAMS	Защита за счет OMS646
№2	41/ж	TTP	174	TTP	34,42	772	30%	aHUS	отвечает
№3	52/ж	TTP	150	TTP	48,32	1399	70%	aHUS	не отвечает
№4	20/м	TTP	224	TTP	36,9	1187	<10%	TTP	отвечает
№10	60/ж	TTP	175,4	TTP	49,5	4406	64%	aHUS	не отвечает
№11	59/ж	TTP	144,9	TTP	40,3	1352	<10%	TTP	не отвечает

№13	49/ж	HUS, рак, TTP	142,8	TTP	48,6	3843	86%	aHUS	не отвечает
№42	27/м	TTP	341,5	TTP	100,0	5332	<5%	TTP	не отвечает
№46	25/ж	TTP, Болезнь Дегоса, SLE	225,11	TTP	53,9	3426	Н/О	Н/О	отвечает
№48	53/ж	TTP, SLE, нефрит с/п трансплантации почки	788,5	aHUS	31,2	1066	66%	aHUS	отвечает
№49	64/ж	TTP, APLA, CVA	494,5		35,4	2100	Н/О	Н/О	отвечает
№51	25/ж	aHUS, APLA	313,1	TTP	26,8	1595	23%	aHUS	отвечает
№52	56/ж	aHUS, SLE	333,1	TTP	18,9	1103	97%	aHUS	не отвечает
№53	56/ж	aHUS, ремиссия	189,9	TTP, ремиссия	28,69	344	74%	aHUS	не отвечает

Сокращения, используемые в ТАБЛИЦЕ 25:

«APLA» = антифосфолипидные антитела, связанные с катастрофическим антифосфолипидным синдромом (CAPS).

«SLE» = системная красная волчанка

«CVA» = нарушение мозгового кровообращения (инсульт)

В соответствии с результатами, приведенными в публикации Stefanescu R. et al., Blood Vol 112 (2):340-349, 2008, значительный апоптоз наблюдали в первичных кожных MVEC в присутствии тринадцати образцов плазмы пациентов с ТМА в отсутствие анти-

MASP-2 антитела. Образцы контрольной плазмы от здоровых людей были протестированы параллельно и не индуцировали апоптоз в MVEC (данные не представлены). Как показано в ТАБЛИЦЕ 25, ингибирующее MASP-2 мАт (OMS646) ингибировало опосредованную плазмой пациентов с ТМА индукцию апоптоза в первичных MVEC («отвечающие» в ТАБЛИЦЕ 25) в 6 из 13 протестированных образцов плазмы пациентов (46%). В частности, следует отметить, что ингибирующее MASP-2 мАт (OMS646) ингибировало апоптоз в плазме, полученной от пациентов, страдающих от aHUS, TTP, болезни Дегоса, SLE, последствий трансплантации и APLA (CAPS). Что касается семи образцов от пациентов, протестированных в данном анализе, в которых анти-MASP-2 мАт не блокировало апоптоз («не отвечающие» в ТАБЛИЦЕ 25), следует отметить, что апоптоз может быть индуцирован несколькими путями, не все из которых зависят от комплемента. Например, как отмечено в публикации Stefanescu R. et al., Blood Vol 112 (2):340-349, 2008, апоптоз в анализе ЕС зависит от базового состояния активации ЕС, на которое влияют факторы плазмы, способные играть роль в определении уровня повреждения, необходимого для индукции апоптоза. Как также отмечено в публикации Stefanescu R. et al., дополнительные факторы, способные модулировать апоптоз, могут присутствовать в плазме пациентов с ТМА, такие как цитокины и различные компоненты системы комплемента. Таким образом, вследствие этих осложняющих факторов, неудивительно, что анти-MASP-2 антитело не оказывает блокирующее действие во всех образцах плазмы, в которых был отмечен индуцируемый ТМА плазмой апоптоз.

Также в этом отношении следует отметить, что аналогичный анализ проводили с использованием в тесте индуцированного ТМА плазмой апоптоза анти-С5 антитела экулизумаба, и были получены очень сходные результаты (смотри Chapin et al., Blood (ASH Annual Meeting Abstracts): Abstract №3342, 120: 2012). Клиническая эффективность экулизумаба, очень успешного коммерческого продукта, очевидно, является большей, чем эффективность, продемонстрированная в этом анализе, это указывает на то, что в данной in vitro модели может быть недооценен клинический потенциал ингибирующих комплемент лекарственных средств.

Полученные результаты показывают, что ингибирующее MASP-2 антитело, такое как OMS646, является эффективным в ингибировании индуцированного ТМА плазмой апоптоза в плазме, полученной от пациентов, страдающих от ТМА, такой как aHUS, TTP, болезнь Дегоса, SLE, последствия трансплантации и APLA (CAPS). Также известно, что эндотелиальные повреждения и апоптоз играют ключевую роль в патологии ТМА, таких как идиопатическая TTP и спорадический HUS (Kim et al., Microvascular Research vol 62(2):83-93, 2001). Как описано в публикации Dang et al., апоптоз был продемонстрирован в красной пульпе селезенки пациентов с TTP, но не у здоровых контрольных субъектов (Dang et al., Blood 93(4):1264-1270, 1999). Признаки апоптоза также были отмечены в гломерулярных клетках почек, происходящих из MVEC, у пациента с HUS (Arends M. J. et al., Hum Pathol 20:89, 1989). Таким образом, ожидается, что введение ингибирующего MASP-2 средства, такого как ингибирующее MASP-2 антитело (например, OMS646),

будет эффективным методом лечения пациентов, страдающих от TMA, такой как aHUS, TTP или другие микроангиопатические заболевания, например, другие TMA, включая CAPS, системную болезнь Дегоса, а также TMA вследствие рака; TMA вследствие химиотерапии или TMA вследствие трансплантации.

В соответствии с вышеизложенным, в одном варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования повреждения эндотелиальных клеток и/или апоптоза эндотелиальных клеток, и/или образования тромбов у субъекта, страдающего от, или имеющего риск развития, тромботической микроангиопатии (TMA), включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления TMA выбирают из группы, состоящей из атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS), тромботической тромбоцитопенической пурпуры (TTP) и гемолитического уремического синдрома (HUS). В одном варианте осуществления TMA представляет собой aHUS. В одном варианте осуществления композицию вводят пациенту с aHUS во время острой фазы заболевания. В одном варианте осуществления композицию вводят пациенту с aHUS во время фазы ремиссии (то есть, субъекту, который восстановился, или частично восстановился, после эпизода острой фазы aHUS, при этом на ремиссию указывает, например, повышение количества тромбоцитов и/или снижение сывороточных концентраций LDH, например, как описано в публикации Loirat C et al., Orphanet Journal of Rare Diseases 6:60, 2011, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки).

В одном варианте осуществления субъект страдает от, или имеет риск развития, TMA, которая представляет собой (i) TMA вследствие рака; (ii) TMA вследствие химиотерапии или (iii) TMA вследствие трансплантации (например, трансплантации органа, такой как трансплантация почки, или трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток). В одном варианте осуществления субъект страдает от, или имеет риск развития, синдрома Апшо-Шульмана (USS). В одном варианте осуществления субъект страдает от, или имеет риск развития, болезни Дегоса. В одном варианте осуществления субъект страдает от, или имеет риск развития, катастрофического антифосфолипидного синдрома (CAPS).

В соответствии с любым из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело имеет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческий MASP-2 с величиной K_D, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в домене CCP1 MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в in vitro анализе в 1% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее, при этом антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', $F(ab)_2$ и $F(ab')_2$, при этом антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, при этом указанное антитело

представляет собой молекулу IgG2, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, при этом молекула IgG4 имеет мутацию S228P и/или при этом антитело существенно не ингибирует классический путь. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не ингибирует альтернативный путь. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не ингибирует классический путь или альтернативный путь (то есть, ингибирует лектиновый путь, при этом не затрагивая классический и альтернативный пути комплемента).

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует индуцированный плазмой апоптоз MVEC в сыворотке субъекта, страдающего от TMA, такой как aHUS (в острой фазе или в фазе ремиссии), гемолитический уремический синдром (HUS), тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (TTP), TMA вследствие рака; TMA вследствие химиотерапии; TMA вследствие трансплантации (например, трансплантации органа, такой как трансплантация почки, или трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток), или в сыворотке субъекта, страдающего от синдрома Апшо-Шульмана (USS), или в сыворотке субъекта, страдающего от болезни Дегоса, или у субъекта, страдающего от катастрофического антифосфолипидного синдрома (CAPS), при этом индуцированный плазмой апоптоз MVEC ингибируется на по меньшей мере 5%, например, по меньшей мере 10%, например, по меньшей мере 20%, например, по меньшей мере 30%, например, по меньшей мере 40%, например, по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80% например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, вплоть до 99%, в сравнении с необработанной сывороткой. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует образование тромбов в сыворотке субъекта, страдающего от TMA (например, такой как aHUS (в острой фазе или в фазе ремиссии), гемолитический уремический синдром (HUS), тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (TTP), TMA вследствие рака; TMA вследствие химиотерапии; TMA вследствие трансплантации (например, трансплантации органа, такой как трансплантация почки, или трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток), или в сыворотке субъекта, страдающего от синдрома Апшо-Шульмана (USS), или в сыворотке субъекта, страдающего от болезни Дегоса, или у субъекта, страдающего от катастрофического антифосфолипидного синдрома (CAPS)), на уровне, по меньшей мере на 20 процентов или более (например, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%) превышающем ингибирующий эффект на отложение C5b-9 в сыворотке.

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту способом доставки через внутривенный катетер или другой катетер.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования образования тромбов у субъекта, страдающего от TMA (такой как aHUS (в острой фазе

или в фазе ремиссии), гемолитический уремический синдром (HUS), тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (TTP), TMA вследствие рака; TMA вследствие химиотерапии; TMA вследствие трансплантации (например, трансплантации органа, такой как трансплантация почки, или трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток), или в сыворотке субъекта, страдающего от синдрома Апшо-Шульмана (USS), или в сыворотке субъекта, страдающего от болезни Дегоса, или у субъекта, страдающего от катастрофического антифосфолипидного синдрома (CAPS)), включающему введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего (I) (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: i) CDR-H1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 31-35 в SEQ ID NO: 67; и ii) CDR-H2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-65 в SEQ ID NO: 67; и iii) CDR-H3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 95-102 в SEQ ID NO: 67, и b) вариабельную область легкой цепи, содержащую: i) CDR-L1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 24-34 в SEQ ID NO: 70; и ii) CDR-L2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-56 в SEQ ID NO: 70; и iii) CDR-L3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 89-97 в SEQ ID NO: 70, или (II) его варианта, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67), и вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 70.

В одном варианте осуществления субъект страдает от TMA, выбранной из группы, состоящей из TMA вследствие рака; TMA вследствие химиотерапии; TMA вследствие трансплантации (например, трансплантации органа, такой как трансплантация почки, или трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток), синдрома Апшо-Шульмана (USS), болезни Дегоса и катастрофического антифосфолипидного синдрома (CAPS).

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его

антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически узнает по меньшей мере часть эпитопа на человеческом MASP-2, узнаваемого эталонным антителом OMS646, содержащим вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 70.

Пример 44

В данном примере описаны начальные результаты текущего клинического испытания фазы 2 по оценке безопасности и клинической эффективности полностью человеческого моноклонального ингибирующего MASP-2 антитела у взрослых пациентов с тромботическими микроангиопатиями (TMA).

Предпосылки

TMA представляют собой семейство редких, изнуряющих и угрожающих жизни заболеваний, характеризующихся наличием чрезмерного количества тромбов (сгустков) - агрегатов тромбоцитов - в микрососудистой системе органов тела, преимущественно в почках и головном мозге.

Методы

Первую стадию открытого клинического испытания фазы 2 проводили с участием субъектов, страдающих от первичного атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS), устойчивого к плазмотерапии aHUS и тромботической тромбоцитопенической пурпуры (TTP). В клиническом испытании фазы 2 не использовали группу плацебо, учитывая угрожающий жизни характер заболевания.

Субъекты имели возраст ≥18 лет при скрининге и были включены в данное исследование только в том случае, если они имели диагноз одной из следующих TMA:

1) Первичный aHUS, диагностированный клинически, с активностью ADAMTS-13 >10% в плазме. Пациенты могут быть включены в исследование при наличии или отсутствии документированной мутации компонентов комплемента или анти-CFH антител. Пациентов разделяют на категории на основании их ответа на плазмотерапию (плазмаферез или инфузию плазмы):

- Пациенты с aHUS, устойчивым к плазмотерапии, для целей данного исследования соответствуют всем из следующих критериев:

(a) при скрининге количество тромбоцитов <150000/мкл, несмотря на по меньшей мере четыре сеанса плазмотерапии до проведения скрининга;

(b) признаки микроангиопатического гемолиза (наличие шизоцитов, сывороточный уровень лактатдегидрогеназы (LDH) > верхнего предела нормы (ВПН), гаптоглобин < НПН); и

(c) сывороточный уровень креатинина > ВПН.

- Пациенты с хроническим отвечающим на плазмотерапию (чувствительным к плазмотерапии) aHUS должны получать по меньшей мере один раз в неделю

плазмотерапию в течение четырех недель до получения первой дозы OMS646, с сывороточным уровнем креатинина > ВПН.

2) TTP, определяемая по наличию одного из следующих признаков:

- количество тромбоцитов <150000/мкл;

- признаки микроангиопатического гемолиза (наличие шизоцитов, сывороточный уровень LDH > ВПН, или гаптоглобина < НПН); и

- активность ADAMTS-13≤10% во время текущего эпизода TTP или исторически.

Примечание: Субъектов исключали из исследования, если они получали терапию экулизумабом в пределах трех месяцев до скрининга. Критерии для пациентов, квалифицируемых как невосприимчивые к плазмотерапии, использовали для целей определения пригодности для участия в данном исследовании. В следующих аспектах изобретения пациент, не восприимчивый к плазмотерапии, которого предстояло лечить ингибитором MASP-2, ранее получал плазмотерапию по меньшей мере один раз, и после такого сеанса плазмотерапии все еще имел один или более клинических признаков aHUS, которые не были адекватно уменьшены или устранены в результате такой плазмотерапии.

Моноклональное антитело, используемое в данном исследовании, OMS646, представляет собой полностью человеческое IgG4 мАт, направленное против человеческого MASP-2. Как продемонстрировано в примере 40, OMS646 авидно связывает рекомбинантный MASP-2 (кажущаяся равновесная константа диссоциации в диапазоне 100 пМ) и проявляет более чем 5000-кратную избирательность относительно гомологичных белков C1s, C1r и MASP-1. В функциональных анализах OMS646 ингибирует лектиновый путь комплемента у человека с активностью в наномолярном диапазоне (концентрация, приводящая к 50% ингибированию [IC_{50}], составляет примерно 3 нМ), но не оказывает существенного влияния на классический путь комплемента. Введение OMS646 либо внутривенной (в/в), либо подкожной (п/к), инъекцией мышам, приматам и человеку приводило к высоким концентрациям в плазме, которые были связаны с подавлением лектинового пути активации в анализах ex vivo. Как дополнительно описано в примере 42, введение OMS646 приводило к уменьшению отложения C5b-9 и образования тромбов в in vitro моделях TMA, и образования тромбов в мышиной модели TMA, таким образом демонстрируя, что OMS646 можно использовать в терапии.

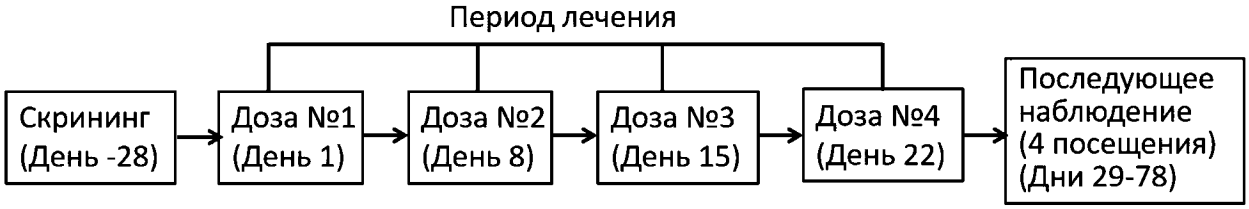
В данном исследовании лекарственная субстанция OMS646 была предоставлена в концентрации 100 мг/мл, ее дополнительно разбавляли для в/в введения. Соответствующий расчетный объем инъекционного раствора OMS646 с концентрацией 100 мг/мл отбирали из флакона при помощи шприца для приготовления дозы. Жидкость из инфузионного мешка вводили в течение четырех часов после приготовления.

На стадии 1 исследования OMS646 вводили в режиме эскалации дозы группам, каждая из которых включала трех субъектов. Каждый субъект на стадии 1 получал четыре еженедельных дозы OMS646, как описано ниже в ТАБЛИЦЕ 26.

ТАБЛИЦА 26: СХЕМА ДОЗИРОВАНИЯ ДЛЯ СТАДИИ 1

Стадия, Группа	Число субъектов	Доза OMS646 (мг/кг)
1, Группа 1	3	0,675, еженедельно x 4
1, Группа 2	3	2,0, еженедельно x 4
1, Группа 3	3	4,0, еженедельно x 4

Схема дизайна исследования на стадии 1



Разбавленный исследуемый препарат вводили внутривенной инфузией в течение 30-минутного периода времени.

Основные критерии оценки

Комбинированными основными критериями оценки были:

- Безопасность на основании результатов определения НЯ, показателей жизненно важных функций, ЭКГ и клинических лабораторных анализов

- Клиническая эффективность на основании изменения количества тромбоцитов

Вторичные критерии оценки

Вторичными критериями оценки были:

- Клиническая активность TMA

Сывороточный уровень LDH

Сывороточный уровень гаптоглобина

Уровень гемоглобина

Сывороточный уровень креатинина

Связанные с TMA симптомы

Необходимость плазмотерапии (плазмафереза или инфузии плазмы)

Необходимость диализа

Допустимые сопутствующие виды лечения

- Устойчивый к плазмотерапии aHUS - плазмотерапия в процессе лечения OMS646 была допустима, если исследователь считал ее необходимой с медицинской точки зрения.

- Хронический отвечающий на плазмотерапию aHUS - исследователи были уведомлены, что плазмотерапию следует продолжать до появления признаков облегчения TMA, например, увеличения количества тромбоцитов, уменьшения уровня LDH, увеличения уровня гаптоглобина, увеличения уровня гемоглобина, уменьшения уровня креатинина, после чего исследователям было рекомендовано приостанавливать плазмотерапию и проводить мониторинг параметров TMA для определения того, можно ли прекращать плазмотерапию.

- TTP - плазмотерапия была допустима, если исследователь считал ее необходимой с медицинской точки зрения.

- Исследователи были уведомлены, что диализ почек следует проводить в соответствии со стандартом оказания медицинской помощи.

- Экулизумаб не вводили в течение исследования.

Результаты

Первая группа субъектов состояла из трех пациентов с aHUS, получавших самую низкую дозу OMS646. Улучшение наблюдали для всех маркеров заболевания TMA у всех пациентов в данной исследуемой группе. Количество тромбоцитов, сывороточные уровни лактатдегидрогеназы (LDH) и сывороточные уровни гаптоглобина измеряли в качестве маркеров активности заболевания. При сравнении с исходными уровнями количество тромбоцитов улучшалось у всех пациентов. Сывороточные уровни LDH оставались нормальными у одного пациента, уменьшались почти до нормального диапазона у другого, и оставались повышенными у третьего. Уровень гаптоглобина улучшался у двух пациентов, у одного нормализовался. Уровни креатинина у одного пациента с независимой от диализа функцией почек также улучшились.

Как было запланировано, в данном клиническом испытании три пациента получали лечение во второй группе со средней дозой. Два пациента имели устойчивый к плазмотерапии aHUS, и один пациент имел тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (TTP). Оба пациента с aHUS получали почечный диализ до, и в процессе, включения в исследование. Во второй группе, или группе со средней дозой, у двух пациентов с устойчивым к плазмотерапии aHUS наблюдали:

- увеличение на 47% среднего количества тромбоцитов, вследствие чего у обоих пациентов количества достигли нормального диапазона

- уменьшение на 86% среднего количества шизоцитов, при этом у одного пациента шизоциты исчезли

- увеличение на 71% среднего уровня гаптоглобина, при этом у обоих пациентов уровень достиг нормального диапазона в процессе лечения, у одного уровень опустился немного ниже нормы через неделю после последней дозы

- уменьшение на 5% средних уровней LDH, при этом у обоих пациентов уровни слегка превышали нормальный диапазон.

Пациенту с TTP в группе со средней дозой требовалась периодическая инфузия плазмы до включения в исследование. Лабораторные параметры не показывали устойчивое улучшение, однако пациенту не требовалась плазмотерапия ни в процессе лечения OMS646, ни после завершения лечения, до настоящего времени.

Лекарственное средство хорошо переносили все пациенты в течение всего периода лечения. Исходя из положительных результатов во второй, или средней дозы, группе, было начато лечение в третьей, или высокой дозы, группе, и пациент с aHUS уже завершил период лечения в исследовании. Данные, приведенные для всех пациентов, включают показатели через неделю после последней дозы.

Первый пациент в третьей (высокой дозы) группе - пациент с устойчивым к плазмотерапии aHUS с дополнительными осложнениями, включая гепатит C,

криоглобулинемию и лимфому - также завершил лечение OMS646. До лечения OMS646 пациенту был необходим регулярный диализ. На протяжении лечения и после завершения курса OMS646, до настоящего времени, пациенту не требуется диализ. Гематологические параметры и параметры почечной функции показали:

- улучшение на 63% количества тромбоцитов, возвращение к нормальным уровням
- уменьшение на 100% количества шизоцитов
- уровни гаптоглобина увеличились от не поддающихся определению уровней и нормализовались
- уменьшение на 43% уровня LDH, в результате уровень лишь слегка выше нормы
- уменьшение на 24% уровней креатинина.

Так же, как и в первой и второй группах, лекарственное средство хорошо переносилось.

Основным критерием оценки в этом открытом клиническом испытании фазы 2 является изменение количества тромбоцитов. Количество тромбоцитов у всех трех пациентов с aHUS в группах средней и высокой дозы (у двоих в группе средней дозы и у одного в группе высокой дозы) вернулось к норме, со статистически значимым средним увеличением от исходного уровня, составляющим примерно 68000 тромбоцитов/мл (p=0,0055).

Подводя итог, полученные до настоящего времени данные в этом клиническом испытании фазы 2 показывают эффективность OMS646 у пациентов с первичным aHUS, устойчивым к плазмотерапии aHUS и у пациентов с TTP.

В соответствии с вышеизложенным, в одном варианте осуществления изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего от устойчивого к плазмотерапии aHUS, включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап идентификации субъекта, страдающего от устойчивого к плазмотерапии aHUS, до введения субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело.

В соответствии с любым из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело имеет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческий MASP-2 с величиной K_D, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в домене CCP1 MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в in vitro анализе в 1% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее, при этом антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', $F(ab)_2$ и $F(ab')_2$, при этом антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG2, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, при этом

молекула IgG4 имеет мутацию S228P. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не ингибирует классический путь (то есть, ингибирует лектиновый путь, не затрагивая классический путь комплемента).

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят в количестве, эффективном для улучшения по меньшей мере одного или более клинических параметров, связанных с aHUS, например, увеличения количества тромбоцитов, уменьшения уровня LDH, увеличения уровня гаптоглобина, увеличения уровня гемоглобина и/или уменьшения уровня креатинина.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ингибирующего MASP-2 антитела субъекту, страдающему от устойчивого к плазмотерапии aHUS, через катетер (например, внутривенно) в течение первого периода времени (например, по меньшей мере одного дня или недели, или двух недель), с последующим введением ингибирующего MASP-2 антитела субъекту подкожно в течение второго периода времени (например, хронической фазы протяженностью по меньшей мере две недели или дольше). В некоторых вариантах осуществления введение в первый и/или второй период времени выполняют без плазмотерапии. В некоторых вариантах осуществления введение в первый и/или второй период времени выполняют в сочетании с плазмотерапией.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ингибирующего MASP-2 антитела субъекту, страдающему от устойчивого к плазмотерапии aHUS, внутривенно, внутримышечно или, предпочтительно, подкожно. Лечение может быть хроническим и применяться ежедневно или ежемесячно, но, предпочтительно, каждые две недели. Ингибирующее MASP-2 антитело можно вводить отдельно или в сочетании с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

В одном варианте осуществления способ включает лечение субъекта, страдающего от устойчивого к плазмотерапии aHUS, включающее введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего (I) (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: i) CDR-H1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 31-35 в SEQ ID NO: 67; и ii) CDR-H2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-65 в SEQ ID NO: 67; и iii) CDR-H3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 95-107 в SEQ ID NO: 67, и b) вариабельную область легкой цепи, содержащую: i) CDR-L1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 24-34 в SEQ ID NO: 70; и ii) CDR-L2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-56 в SEQ ID NO: 70; и iii) CDR-L3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 89-97 в SEQ ID NO: 70, или (II) его варианта, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей

мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67), и вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически узнает по меньшей мере часть эпитопа на человеческом MASP-2, узнаваемого эталонным антителом OMS646, содержащим вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 70.

Пример 45

В данном примере описаны дополнительные результаты, полученные в текущем клиническом испытании фазы 2 для оценки безопасности и клинической эффективности полностью человеческого моноклонального ингибирующего MASP-2 антитела у взрослых пациентов с тромботическими микроангиопатиями (TMA), описанном в примере 44.

Предпосылки

Как описано в примере 44, TMA представляют собой семейство редких, изнуряющих и угрожающих жизни заболеваний, характеризующихся наличием чрезмерного количества тромбов (сгустков) - агрегатов тромбоцитов - в микрососудистой системе органов тела, преимущественно в почках и головном мозге. Как описано в настоящем документе, связанная с трансплантатом TMA (TA-TMA) является разрушительным синдромом, который может развиваться у получивших трансплантат пациентов, например, у реципиентов трансплантата гемопоэтических стволовых клеток (HSCT). В данном примере описаны начальные результаты клинического испытания фазы 2 для оценки безопасности и клинической эффективности полностью человеческого моноклонального ингибирующего MASP-2 антитела у пациентов, страдающих от связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток TMA.

Методы

Как описано в примере 44, испытание фазы 2 для изучения TMA состоит из стадии введения трех уровней доз, с последующей стадией введения фиксированной дозы ингибирующего MASP-2 антитела OMS646. Как также описано в примере 44, положительные результаты были получены для пациентов с aHUS и одного пациента с TTP, с последовательным и надежным улучшением показателей эффективности. Как и в группе низкой дозы, OMS646 хорошо переносили все пациенты в группах средней и

высокой дозы в течение всего периода лечения. Доклинические исследования токсичности были проведены и продемонстрировали отсутствие проблем с безопасностью, что позволило проводить периодическое введение доз в клинических исследованиях.

Как описано в примере 44, данные по OMS646 были получены в клиническом испытании фазы 2 для изучения TMA с участием пациентов с aHUS и TTP. К настоящему времени введение доз было завершено для дополнительного пациента с TMA, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, в группе высокой дозы с использованием способов, описанных в примере 44. Этот пациент имел в анамнезе лимфому, в связи с которой он получил трансплантат гемопоэтических стволовых клеток. Его состояние после трансплантации было осложнено целым рядом угрожающих жизни заболеваний, включая TMA, в результате которой ему было необходимо переливание тромбоцитарной массы. Несмотря на переливания, у него сохранялась TMA, связанная с трансплантатом стволовых клеток, и он был включен в исследование фазы 2 с введением OMS646.

Результаты

После четырехнедельного периода дозирования (группа высокой дозы), как описано в примере 44, у пациента с TMA, связанной с трансплантатом стволовых клеток, наблюдали:

- увеличение в четыре раза количества тромбоцитов, что привело к количеству тромбоцитов, превышающему 100000;

- уровень гаптоглобина увеличился более чем в два раза и стал нормальным;

- уровень в плазме лактатдегидрогеназы, показателя повреждения кровеносных сосудов, уменьшился на 35%, но был все еще выше нормы;

- количество шизоцитов сохранялось на уровне одного.

На протяжении всего периода введения доз OMS646 и после завершения лечения OMS646 пациент не нуждался в переливании тромбоцитарной массы или плазмаферезе.

Подводя итог, данные, полученные до настоящего времени в этом клиническом испытании фазы 2 (как описано в примере 44 и в данном примере), демонстрируют эффективность OMS646 у пациентов с первичным aHUS, устойчивым к плазмотерапии aHUS, TTP, а также у пациента с TMA, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток.

В соответствии с вышеизложенным, в одном варианте осуществления изобретение относится к способу лечения субъекта-человека, страдающего от TMA, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления субъект страдает от TMA, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, которая устойчива к лечению переливанием тромбоцитарной массы и/или плазмаферезом. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает идентификацию субъекта-человека, страдающего от TMA, связанной с трансплантатом

гемопоэтических стволовых клеток, которая устойчива к лечению переливанием тромбоцитарной массы и/или плазмаферезом, перед этапом введения субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента.

В соответствии с любым из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело имеет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческий MASP-2 с величиной K_D, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в домене CCP1 MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в in vitro анализе в 1% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее, при этом антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', $F(ab)_2$ и $F(ab')_2$, при этом антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG2, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, при этом молекула IgG4 имеет мутацию S228P. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не ингибирует классический путь (то есть, ингибирует лектиновый путь, не затрагивая классический путь комплемента).

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят в количестве, эффективном для улучшения по меньшей мере одного или более клинических параметров, ассоциированных с ТМА, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, например, увеличения количества тромбоцитов (например, увеличения по меньшей мере в два, по меньшей мере в три, по меньшей мере в четыре раза количества тромбоцитов до начала лечения), повышения уровня гаптоглобина и/или снижения уровня лактатдегидрогеназы.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ингибирующего MASP-2 антитела субъекту, страдающему от ТМА, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, через катетер (например, внутривенно) в течение первого периода времени (например, по меньшей мере одного дня или недели, или двух недель), с последующим введением ингибирующего MASP-2 антитела субъекту подкожно в течение второго периода времени (например, хронической фазы протяженностью по меньшей мере две недели или дольше). В некоторых вариантах осуществления введение в первый и/или второй период времени выполняют без плазмотерапии. В некоторых вариантах осуществления введение в первый и/или второй период времени выполняют в сочетании с плазмотерапией.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ингибирующего MASP-2 антитела субъекту, страдающему от ТМА, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, внутривенно, внутримышечно или, предпочтительно,

подкожно. Лечение может быть хроническим и применяться ежедневно или ежемесячно, но, предпочтительно, каждые две недели. Ингибирующее MASP-2 антитело можно вводить отдельно или в сочетании с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

В одном варианте осуществления способ включает лечение субъекта, страдающего от ТМА, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, включающее введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего (I) (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: i) CDR-H1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 31-35 в SEQ ID NO: 67; и ii) CDR-H2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-65 в SEQ ID NO: 67; и iii) CDR-H3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 95-107 в SEQ ID NO: 67, и b) вариабельную область легкой цепи, содержащую: i) CDR-L1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 24-34 в SEQ ID NO: 70; и ii) CDR-L2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-56 в SEQ ID NO: 70; и iii) CDR-L3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 89-97 в SEQ ID NO: 70, или (II) его варианта, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67), и вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически узнает по меньшей мере часть эпитопа на человеческом MASP-2, узнаваемого эталонным антителом OMS646, содержащим вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 70.

Пример 46

В данном примере описаны дополнительные результаты, полученные в текущем клиническом испытании фазы 2 для оценки безопасности и клинической эффективности полностью человеческого моноклонального ингибирующего MASP-2 антитела у взрослых

пациентов с тромботическими микроангиопатиями (ТМА), описанном в примерах 44 и 45.

Предпосылки

Как описано в примере 45, связанная с трансплантатом ТМА (ТА-ТМА) является разрушительным синдромом, который может развиваться у получивших трансплантат пациентов, например, у реципиентов трансплантата гемопоэтических стволовых клеток (HSCT). Связанная с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток ТМА (HSCT-ТМА) является угрожающим жизни осложнением, которое инициируется повреждением эндотелия. Почка является органом, который поражается чаще всего, хотя HSCT-ТМА может быть мультисистемным заболеванием, также затрагивающим легкие, кишечник, сердце и головной мозг. Наличие даже слабо выраженной ТМА связано с долговременной почечной недостаточностью. Развитие связанной с аллогенной HSCT ТМА различается по частоте случаев в зависимости от разных диагностических критериев и кондиционирования, а также от режимов профилактики реакции трансплантат против хозяина, при которых наиболее часто используемыми лекарственными средствами являются ингибиторы кальцийнейрина (Ho VT et al., Biol Blood Marrow Transplant, 11(8):571-5, 2005). Изменение режима введения иммуносупрессивных ингибиторов кальцийнейрина может приводить к ослаблению ТМА у некоторых пациентов в пределах нескольких недель после уменьшения или прекращения введения ингибиторов кальцийнейрина.

ТМА является потенциально угрожающим жизни осложнением HSCT, и ее в настоящее время контролируют главным образом за счет уменьшения стимулирующих факторов, в том числе за счет избегания иммунодепрессантов (например, ингибиторов кальцийнейрина) и лечения текущих инфекций, а также за счет поддерживающих мер, таких как гемодиализ. Хотя многие пациенты с HSCT-ТМА хорошо отвечают на уменьшение или прекращение введения иммунодепрессантов, существует подгруппа пациентов, которые имеют стойкую HSCT-ТМА, несмотря на меры консервативного лечения (то есть, ТМА не отвечает на уменьшение или прекращение введения иммунодепрессантов). Пациенты, которые не отвечают на эти консервативные методы лечения, имеют плохой прогноз. Обмен плазмы является неэффективным, и никакие другие методы лечения не одобрены.

В Примере 45 описаны начальные положительные результаты клинического испытания фазы 2 для оценки безопасности и клинической эффективности полностью человеческого моноклонального ингибирующего MASP-2 антитела (OMS646) у пациентов, страдающих от стойкой связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток ТМА (HSCT-ТМА). В данном примере описаны дополнительные результаты текущего клинического испытания фазы 2 для оценки безопасности и клинической эффективности OMS646 у трех дополнительных субъектов, страдающих от стойкой HSCT-ТМА, устойчивой к консервативным методам лечения.

Методы

Как описано в примере 44, испытание фазы 2 для изучения ТМА состоит из стадии

введения трех уровней доз, с последующей стадией введения фиксированной дозы ингибирующего MASP-2 антитела OMS646. OMS646 хорошо переносили все пациенты в группах низкой, средней и высокой дозы на всем протяжении периода лечения. Доклинические исследования токсичности были завершены и показали отсутствие проблем с безопасностью, что позволяет периодически вводить дозы в клинических испытаниях.

В клиническом испытании фазы 2 для изучения TMA принимают участие субъекты, страдающие от стойкой связанной с HSCT TMA, устойчивой к консервативным методам лечения, которую определяют для целей данного исследования, как характеризующуюся всеми из следующих признаков по меньшей мере через две недели после уменьшения или прекращения введения иммунодепрессанта (например, введения ингибиторов кальцийнейрина), или по меньшей мере через 30 дней после трансплантации:

- Тромбоцитопения (количество тромбоцитов <150000/мкл); и

- Признаки микроангиопатической гемолитической анемии (наличие шизоцитов, сывороточный уровень лактатдегидрогеназы (LDH) > верхнего предела нормы (ВПН) или уровень гаптоглобина < нижнего предела нормы (НПН).

Допустимые сопутствующие методы лечения для связанной с HSCT TMA

- Плазмотерапия при лечении OMS646 допустима, если исследователь считает ее необходимой с медицинской точки зрения. Пациенты, получающие плазмотерапию, могут получать дополнительные половины доз OMS646.

- Исследователи были уведомлены, что диализ почек следует проводить в соответствии со стандартом оказания медицинской помощи.

- Экулизумаб не вводили в течение исследования.

В текущее исследование TMA включены субъекты, страдающие от стойкой HSCT-TMA, которая устойчива к стандартным методам лечения (то есть, стойкая TMA по меньшей мере через две недели после уменьшения или прекращения введения ингибиторов кальцийнейрина).

Как описано в примере 45, дозирование было завершено для пациента, страдающего от стойкой HSCT-TMA (пациент №1) в группе высокой дозы (4 мг/кг OMS646, в/в введение один раз в неделю в течение четырех недель) с использованием способов, описанных в примере 44.

К настоящему времени дозирование завершено еще для 4 пациентов, страдающих от стойкой HSCT-TMA, как описано ниже.

Пациент №1 (описан в примере 44) получал лечение OMS646 в течение четырех недель (4 мг/кг в/в один раз в неделю);

Пациенты №2 и №3 получали лечение OMS646 в течение восьми недель (4 мг/кг в/в один раз в неделю);

Пациенты №4 и №5 получали лечение OMS646 (4 мг/кг в/в один раз в неделю) в течение двух и трех недель, соответственно. Пациенты №4 и №5 прекратили участие в исследовании через две и три недели, соответственно, не отвечали на лечение и их

состояние ухудшилось. Следует отметить, что один из этих пациентов имел значительно повышенный уровень креатинина в момент включения в исследование.

Результаты

В данное исследование были включены пять пациентов со стойкой HSCT-TMA. Все субъекты были взрослыми и получили HSCT в связи со злокачественными болезнями крови. На ФИГУРАХ 58, 59 и 60 показано изменение от базового уровня показателей TMA после лечения ингибирующим MASP-2 антителом OMS646. На этих ФИГУРАХ приведены данные для всех трех пациентов, два из которых прекратили участие в исследовании через 2-3 недели, у одного впоследствии произошел рецидив, а другой получал паллиативное лечение. Как показано на ФИГУРАХ 58, 59 и 60, последнее возможное лечение было проведено в неделю 7.

На ФИГУРЕ 58 приведен график, показывающий среднее изменение количества тромбоцитов от исходного уровня с течением времени (недели) у субъектов, страдающих от стойкой, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, тромботической микроангиопатии (HSCT-TMA), после лечения ингибирующим MASP-2 антителом (OMS646).

На ФИГУРЕ 59 приведен график, показывающий среднее изменение уровня LDH от исходного уровня с течением времени (недели) у субъектов, страдающих от стойкой HSCT-TMA, после лечения ингибирующим MASP-2 антителом (OMS646).

На ФИГУРЕ 60 приведен график, показывающий среднее изменение уровня гаптоглобина от исходного уровня с течением времени (недели) у субъектов, страдающих от стойкой HSCT-TMA, после лечения ингибирующим MASP-2 антителом (OMS646).

Как показано на ФИГУРАХ 59 и 60, в процессе лечения наблюдалось статистически значимое улучшение показателей для LDH и гаптоглобина. Как показано на ФИГУРЕ 58, количество тромбоцитов увеличилось, но это увеличение не достигло уровня статистической значимости для такого небольшого количества пациентов. Из трех пациентов, завершивших лечение, у одного не наблюдали улучшение показателей для креатинина, но он параллельно получал нефротоксические средства. У остальных двух пациентов показатели для креатинина улучшились или оставались нормальными. Во время продолжительного периода последующего наблюдения у одного пациента произошло отторжение трансплантата, и он ожидает второй трансплантат. Другие два пациента остаются стабильными.

Несмотря на потенциально смешанные эффекты лекарственных средств, связанных с подавлением функции костного мозга и нефротоксичностью, у двух субъектов, полезные эффекты лечения OMS646 наблюдали у трех субъектов, страдающих от стойкой HSCT-TMA (один из которых описан в примере 45), и они дополнительно описаны ниже. Примечательно, что эффекты лечения у каждого из трех ответивших на лечение пациентов были впервые отмечены через примерно три недели лечения OMS646.

Пациент №1 (получал лечение в течение 4 недель, как описано в примере 45). Вкратце, количество тромбоцитов увеличилось в четыре раза, в результате чего

количество тромбоцитов составило более 100000/мкл; уровень гаптоглобина вырос более чем в два раза и был нормальным; уровень в плазме лактатдегидрогеназы уменьшился на 35%, но все еще оставался выше нормы; и количество шистоцитов сохранялось на уровне одного.

Пациент №2 (получал лечение в течение 8 недель): количество тромбоцитов не изменилось в процессе лечения, хотя пациент также страдал от подавления функции костного мозга вследствие параллельного лечения валганцикловиром, и у него впоследствии произошло отторжение трансплантата; уровень в плазме лактатдегидрогеназы снизился от 712 Ед/л до всего лишь 256 Ед/л; уровень гаптоглобина увеличился от неподдающихся обнаружению уровней вплоть до 250 мг/дл.

Пациент №3 (получал лечение в течение 8 недель): количество тромбоцитов увеличилось от 13500/мкл до 133000/мкл; уровень в плазме лактатдегидрогеназы снизился от 537 до 225 Ед/л, уровень гаптоглобина увеличился от неподдающихся обнаружению уровней вплоть до 181 мг/дл.

Резюме результатов

Для трех пациентов, страдающих от стойкой связанной с HSCT TMA, завершивших введение доз OMS646, данные показывают сильную и устойчивую эффективность. Статистически значимое улучшение показателей LDH и гаптоглобина наблюдали в процессе лечения. Количество тромбоцитов увеличилось, но это увеличение не достигло уровня статистической значимости для такого небольшого количества пациентов. Из трех пациентов, завершивших лечение, показатель для креатинина не улучшился у одного пациента, но он параллельно принимал нефротоксические средства. У остальных двух пациентов показатели для креатинина улучшились или оставались нормальными.

Выводы

OMS646 приводило к улучшению маркеров TMA у пациентов, страдающих от стойкой HSCT-TMA, которые не отвечали на консервативные методы лечения. Пациенты с HSCT-TMA, получавшие OMS646, относятся к числу наиболее трудно поддающихся лечению пациентов, вследствие чего полученные результаты являются клиническим доказательством терапевтического эффекта OMS646 у пациентов с опасной стойкой HSCT-TMA, сохраняющейся несмотря на применение консервативных методов лечения.

В соответствии с вышеизложенным, в одном варианте осуществления изобретение относится к способу лечения субъекта-человека, страдающего от TMA, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления субъект страдает от стойкой TMA, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, которая устойчива к консервативным методам лечения. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает идентификацию субъекта-человека, страдающего от стойкой TMA, связанной с

трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, которая устойчива к консервативным методам лечения, перед этапом введения субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента.

В соответствии с любым из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело имеет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческий MASP-2 с величиной K_D, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в домене CCP1 MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в in vitro анализе в 1% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее, при этом антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', $F(ab)_2$ и $F(ab')_2$, при этом антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG2, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, при этом молекула IgG4 имеет мутацию S228P. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не ингибирует классический путь (то есть, ингибирует лектиновый путь, не затрагивая классический путь комплемента).

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят в количестве, эффективном для улучшения по меньшей мере одного или более клинических параметров, ассоциированных с ТМА, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, например, увеличения количества тромбоцитов (например, увеличения по меньшей мере в два, по меньшей мере в три, по меньшей мере в четыре раза количества тромбоцитов до начала лечения), повышения уровня гаптоглобина и/или снижения уровня лактатдегидрогеназы.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ингибирующего MASP-2 антитела субъекту, страдающему от ТМА, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, через катетер (например, внутривенно) в течение первого периода времени (например, по меньшей мере одного дня или недели, или двух недель, или трех недель, или четырех недель или более), с последующим введением ингибирующего MASP-2 антитела субъекту подкожно в течение второго периода времени (например, хронической фазы протяженностью по меньшей мере две недели или дольше). В некоторых вариантах осуществления введение в первый и/или второй период времени выполняют без плазмотерапии. В некоторых вариантах осуществления введение в первый и/или второй период времени выполняют в сочетании с плазмотерапией.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ингибирующего MASP-2 антитела субъекту, страдающему от ТМА, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, внутривенно, внутримышечно или подкожно.

Лечение может быть хроническим и применяться ежедневно или ежемесячно, но, предпочтительно, по меньшей мере каждые две недели, или по меньшей мере один раз в неделю, например, два раза в неделю или три раза в неделю. Ингибирующее MASP-2 антитело можно вводить отдельно или в сочетании с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

В одном варианте осуществления способ включает лечение субъекта, страдающего от стойкой TMA, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, включающее введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит ингибирующее MASP-2 антитело, содержащее (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: i) CDR-H1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 31-35 в SEQ ID NO: 67; и ii) CDR-H2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-65 в SEQ ID NO: 67; и iii) CDR-H3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 95-107 в SEQ ID NO: 67, и b) вариабельную область легкой цепи, содержащую: i) CDR-L1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 24-34 в SEQ ID NO: 70; и ii) CDR-L2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-56 в SEQ ID NO: 70; и iii) CDR-L3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 89-97 в SEQ ID NO: 70, или (II) его вариант, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67), и вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически узнает по меньшей мере часть эпитопа на человеческом

MASP-2, узнаваемого эталонным антителом OMS646, содержащим вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту, страдающему от, или имеющему риск развития, TMA, связанной с HSCT, включая субъекта, страдающего от стойкой TMA, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, которая устойчива к консервативным методам лечения, композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, в дозе от 1 мг/кг до 10 мг/кг (то есть, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг или 10 мг/кг) по меньшей мере один раз в неделю (например, по меньшей мере два раза в неделю или по меньшей мере три раза в неделю) в течение периода времени по меньшей мере 3 недели или по меньшей мере 4 недели, или по меньшей мере 5 недель, или по меньшей мере 6 недель, или по меньшей мере 7 недель, или по меньшей мере 8 недель.

Пример 47

В данном примере описан клинический случай, демонстрирующий эффективность лечения связанной с реакцией трансплантат против хозяина (GVHD) микроангиопатии ингибирующим MASP-2 антителом OMS646.

Предпосылки

Реакция трансплантат против хозяина является обычным осложнением трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT). Существуют как острая, так и хроническая, формы, которые возникают в результате того, что донорские иммунные клетки воспринимают ткани пациента-реципиента, как чужеродные. Это запускает иммунный ответ против пациента-реципиента. Острая GvHD возникает у примерно 50% или более пациентов, получивших аллогенные трансплантаты. При острой GvHD мишенью чаще всего является кожа, желудочно-кишечный тракт и печень, но она также может затрагивать почки, глаза, легкие и клетки крови. Хроническая GvHD развивается у примерно 40% пациентов, получивших аллогенные трансплантаты, и чаще всего поражает кожу, печень, глаза, желудочно-кишечный тракт и легкие. Как острая, так и хроническая, GvHD связаны с высокой заболеваемостью и смертностью.

Методы и результаты

46-летний мужчина, страдающий от Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (T-ALL), во время второй полной ремиссии (ПР) прошел полное миелоаблативное кондиционирование циклофосфамидом с облучением всего тела (TBI-Cy) и перенес аллогенную HSCT трансплантацию стволовых клеток периферической крови (PBSC) от неродственного донора - 35-летней женщины, 9/10 HLA-совместимой (антигенное несовпадение в локусе A). Профилактика реакции трансплантат против хозяина (GVHD) была основана на применении антитимоцитарного глобулина (ATG, 5 мг/кг) в процессе кондиционирования, циклоспорина A (CSA) и короткого курса метотрексата (то есть,

метотрексат в день +1, +3, +6 (уменьшение дозы вследствие низкого содержания CD34+)). У пациента было достигнуто надежное гематологическое восстановление (приживление трансплантата: БКК >1000/мл, нейтрофилы >500/мл в день +15; тромбоциты >20000/мл в день +18, 50000/мл в день +21). Наблюдали полный донорский химеризм (костный мозг и периферическая кровь, CD3+ и CD3- фракция) в день +30, +60, +90, +180, +354. Полная ремиссия была подтверждена (иммунофенотип, молекулярное MRD) в день +30, +60, +90, +180.

В день +35 после трансплантации у пациента развилась желудочно-кишечная (ЖК) GVHD (с проявлениями в виде рвоты, анорексии, диареи, боли в области живота; при колоноскопии: диффузные эрозии; гистология: диффузные изъязвления слизистой оболочки, лимфогранулоцитарное воспаление в собственной пластинке слизистой оболочки, деформация железы и крипты, апоптотические тельца), и у него была диагностирована острая GvHD, 4 стадии (кишечник), с общим баллом 4, наряду с вызванным цитомегаловирусом (CMV) колитом (определенным по положительному результату иммуногистохимического анализа и результату ПЦР в реальном времени биопсийного образца кишечника; системная реактивация CMV (2614 МЕ/мл в периферической крови). Два состояния одновременно лечили метилпреднизолоном (1 мг/кг), фоскарнетом и ганцикловиром, с хорошим результатом, и стероидами в постепенно уменьшающихся, до отмены, дозах.

В день +121 после трансплантации у пациента случился рецидив рефрактерной к стероидам ЖК GVHD (с проявлениями в виде рвоты, анорексии, диареи, боли в области живота; гистологическими нарушениями (в желудке и двенадцатиперстной кишке), и у него было диагностировано позднее начало острой ЖК GvHD 4 стадии (кишечник), с общим баллом 4, которую лечили, с хорошим результатом, постоянным введением CSA и последовательным введением пентостатина и мезенхимальных стволовых клеток в соответствии с зарегистрированным клиническим испытанием (ClinicalTrials.Gov Identifier NCT02032446).

В день +210 после трансплантации у пациента наблюдалось снижение массы тела, выраженная астения, генерализованная мышечная атрофия, тетрапарез, снижение глубоких сухожильных рефлексов, двусторонняя парестезия икры, нейрогенный мочевой пузырь и недержание мочи при отсутствии мочеиспускательного раздражителя. Результаты клинического обследования и анализа цереброспинальной жидкости, нейрорадиологического и электрофизиологического обследования указывали на аксональную, сенсорно-двигательную и вегето-сосудистую полиневропатию. Нейрорадиологическое исследование показало нормальную картину МРТ (мозг и позвоночник), и цереброспинальная жидкость была в норме. Рецидив T-ALL, инфекции, повреждение сосудов, недостаточность питания, демиелинизирующее заболевание и синдром обратимой задней энцефалопатии (PRES) были исключены. Введение высокой дозы иммуноглобулина не принесло пользу. Была обнаружена сопутствующая тромбоцитопения (6×10^9/л) с признаками макроангиопатической гемолитической анемии

(6,7 г/дл) без почечной недостаточности, ретикулоцитоз (335×109/л), повышенный уровень LDH (1635 Ед/л) и неподдающиеся обнаружению уровни гаптоглобина. Прямой антиглобулиновый тест дал отрицательный результат. Результаты анализов: шизоциты в мазке периферической крови (2-3/поле 50х), отсутствие анти-В Ат (основная несовместимость пациента/донора), активность ADAMTS-13 в норме, отсутствие анти-ADAMTS-13 Ат, нормальные результаты тестов на коагуляцию и протеинурия с нормальными уровнями креатинина. У него также имела место мелена, с документированным изъязвлением кишечника при эндоскопическом обследовании; при гистопатологическом исследовании был обнаружен отек слизистой оболочки, фиброз, расширенные мелкие сосуды с внутрипросветным отложением фибрина, гландулярная атрофия и апоптотические тельца, без микробного заражения. Таким образом, хотя имели место признаки стойкой ЖК GVHD, клиническая и гистопатологическая картина также соответствовала диагнозу связанной с трансплантатом тромботической микроангиопатии кишечника. Из-за рецидивирующей ЖК GVHD дозу CSA постепенно уменьшали, но препарат не отменяли (минимальный уровень 100-150 нг/мл), без достижения клинических или гематологических изменений.

В день +263 после трансплантации пациент был включен в клиническое испытание, описанное выше в примерах 45 и 46, которое включало лечение при помощи OMS646, ингибирующего MASP-2 антитела, которое ингибирует лектиновый путь активации комплемента. Как показано на ФИГУРЕ 61, после первых 2 еженедельных доз лекарственного средства наблюдали изменение клинических признаков и лабораторных показателей, с исчезновением мелены и гемолиза, и увеличением количества тромбоцитов. Интересно, что после 4 доз также было задокументировано значительное неврологическое улучшение, с улучшением как клинических, так и электрофизиологических показателей сенсорно-двигательных нарушений. После 8 доз OMS646 состояние GvHD сохранялось, несмотря на уменьшение доз CSA, без наблюдаемой токсичности. Ко дню +354 после трансплантации у пациента наблюдали дальнейшее неврологическое улучшение и начало устранения проблем с мочеиспусканием. Быстрое клиническое улучшение, достигнутое у данного пациента, свидетельствует о том, что эффективное ингибирование опосредованного комплементом повреждения эндотелия в результате введения OMS646 может быть высокоэффективным в лечении связанной с GVHD TMA.

Подводя итог, в данном примере описан клинический случай пациента после HSCT трансплантации, имеющего одновременно HSCT-TMA и GvHD, оба состояния прекратились после лечения ингибирующим MASP-2 антителом (OMS646). До начала лечения OMS646 у пациента было тяжелое пост-трансплантационное состояние, осложненное множественными эпизодами рефрактерной к стероидам GvHD, цитомегаловирусной инфекцией и HSCT-TMA. После двух предшествующих эпизодов GvHD у пациента развилась кровавая диарея. Результаты биопсии кишечника показали наличие как HSCT-TMA, так и GvHD. Не было выявлено никакой инфекции.

Примечательно, что у пациента также впервые возникли неврологические симптомы парестезии, тетраплегии и нейрогенного мочевого пузыря, которые были расценены как неврологические проявления GvHD и TMA. Пациент не мог ходить вследствие тетраплегии и нуждался в переливаниях крови по меньшей мере один раз в сутки. Гематологические маркеры показали наличие HSCT-TMA с тромбоцитопенией, повышенным уровнем лактатдегидрогеназы (LDH) и шизоцитами. Пациент был включен в клиническое испытание и начал получать OMS646. Его лечение иммунодепрессантами (циклоспорин) было сокращено на 2 недели раньше, и он получал лишь низкую дозу кортикостероидов, учитывая его рефрактерную к стероидам GvHD в анамнезе. Он не получал другое лечение от GvHD. Его кровавая диарея прекратилась, и его гематологические маркеры улучшились после 2 доз OMS646. После 4 доз OMS646 он смог ходить. Он завершил 8-недельное лечение OMS646 и, находясь дома, чувствует себя хорошо. Все признаки и симптомы HSCT-TMA и GvHD прекратились. Его неврологические симптомы продолжают ослабевать. До лечения OMS646 данный пациент угасал и имел высокий риск ранней смерти. После лечения OMS646 наблюдали уменьшение проявлений GvHD, HSCT-TMA и неврологических симптомов, и, находясь дома, пациент чувствует себя хорошо.

В соответствии с вышеизложенным, в одном варианте осуществления изобретение относится к способу лечения субъекта-человека, страдающего от, или имеющего риск развития, реакции трансплантат против хозяина (GVHD), включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента, и за счет этого лечение, или уменьшение риска развития, GVHD, или уменьшение степени тяжести одного или более симптомов, связанных с GVHD. В одном варианте осуществления GVHD представляет собой активную острую GVHD. В одном варианте осуществления GVHD представляет собой хроническую GVHD. В одном варианте осуществления GVHD является резистентной к стероидам (то есть, стойкой, несмотря на лечение стероидами). В одном варианте осуществления GVHD представляет собой желудочно-кишечную (ЖК) GVHD. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает этап определения наличия GVHD у субъекта перед началом лечения ингибирующим MASP-2 антителом.

В одном варианте осуществления субъект страдает от, или имеет риск развития, GVHD, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток. В одном варианте осуществления субъект страдает от, или имеет риск развития, GVHD, ассоциированной с TMA, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток. В одном варианте осуществления субъект страдает от лейкоза, такого как Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз.

В одном варианте осуществления субъект страдает от одного или более неврологических симптомов, связанных с GvHD и/или TMA, таких как, например, астения, парестезия, тетраплегия, сенсорно-двигательные нарушения, вегето-сосудистая

полиневропатия и/или нейрогенный мочевой пузырь, и ингибирующее MASP-2 антитело вводят в количестве, и в течение периода времени, которые достаточны для облегчения одного или более неврологических симптомов.

В соответствии с любым из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело имеет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческий MASP-2 с величиной K_D, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в домене CCP1 MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в in vitro анализе в 1% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее, при этом антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', $F(ab)_2$ и $F(ab')_2$, при этом антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG2, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, при этом молекула IgG4 имеет мутацию S228P. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не ингибирует классический путь (то есть, ингибирует лектиновый путь, не затрагивая классический путь комплемента).

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят в количестве, эффективном для улучшения по меньшей мере одного или более клинических параметров, ассоциированных с GVHD.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ингибирующего MASP-2 антитела субъекту, страдающему от GVHD, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, внутривенно, внутримышечно или подкожно. Лечение может быть хроническим и применяться ежедневно или ежемесячно, но, предпочтительно, по меньшей мере каждые две недели, или по меньшей мере один раз в неделю, например, два раза в неделю или три раза в неделю. Ингибирующее MASP-2 антитело можно вводить отдельно или в сочетании с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

В одном варианте осуществления способ включает лечение субъекта, страдающего от GVHD, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, включающее введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит ингибирующее MASP-2 антитело, содержащее (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: i) CDR-H1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 31-35 в SEQ

ID NO: 67; и ii) CDR-H2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-65 в SEQ ID NO: 67; и iii) CDR-H3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 95-107 в SEQ ID NO: 67, и b) вариабельную область легкой цепи, содержащую: i) CDR-L1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 24-34 в SEQ ID NO: 70; и ii) CDR-L2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-56 в SEQ ID NO: 70; и iii) CDR-L3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 89-97 в SEQ ID NO: 70, или (II) его вариант, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67), и вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически узнает по меньшей мере часть эпитопа на человеческом MASP-2, узнаваемого эталонным антителом OMS646, содержащим вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту, страдающему от, или имеющему риск развития, GVHD, такому как субъект, который будет получать, получает или получил HSCT, включая субъекта, страдающего от связанной с GVHD TMA, композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, в дозе от 1 мг/кг до 10 мг/кг (то есть, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг или 10 мг/кг) по меньшей мере один раз в неделю (например, по меньшей мере два раза в неделю или по меньшей мере три раза в неделю) в течение периода времени по меньшей мере 3 недели или по меньшей мере 4 недели, или по меньшей мере 5 недель, или по меньшей мере 6 недель, или по меньшей мере 7 недель, или по меньшей мере 8 недель.

Пример 48

В данном примере описан клинический случай, демонстрирующий эффективность лечения TMA и диффузного альвеолярного кровотечения (DAH) после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток ингибирующим MASP-2 антителом OMS646.

Предпосылки

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (HSCT) индуцирует значительное эндотелиальное повреждение, которое вносит вклад в серьезные пост-HSCT осложнения, такие как тромботическая микроангиопатия (TMA), реакция трансплантат против хозяина (GvHD), диффузное альвеолярное кровотечение (DAH) и веноокклюзионная болезнь (VOD). (Смотри E. Carreras and M. Diaz-Ricart, Bone Marrow Transplant vol 46:1495-1502, 2011; Akil et al., Biol Blood Marrow Transplant 21:1739-1745, 2015; и Vion et al., Semin Thromb Hemost 41(06):629-643, 2015, содержание каждой из публикаций включено в настоящий документ посредством ссылки).

Диффузное альвеолярное кровотечение (DAH) представляет собой синдром, который может развиваться у реципиента трансплантата гемопоэтических стволовых клеток (HSCT). Диагностические критерии DAH у реципиента HSCT включают легочные инфильтраты, диспноэ и гипоксию (смотри публикацию E. Carreras and M. Diaz-Ricart, Bone Marrow Transplant vol 46:1495-1502, 2011, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки). Предполагаемым патогенезом DAH является повреждение легочного капиллярного эндотелия за счет кондиционирования HSCT, плюс пересаженные нейтрофилы и скрытые инфекции, делающие возможной утечку эритроцитов в легочные альвеолы (E. Carreras and M. Diaz-Ricart, Bone Marrow Transplant vol 46:1495-1502). Веноокклюзионная болезнь (VOD), также известная как синдром синусоидальной обструкции (SOS), является другим синдромом, который может развиваться у получившего трансплантат гемопоэтических стволовых клеток (HSCT) пациента. Клинические проявления VOD включают выраженное увеличение массы тела вследствие задержки жидкости, увеличение размера печени и повышение уровней билирубина в крови (смотри E. Carreras and M. Diaz-Ricart, Bone Marrow Transplant vol 46:1495-1502, содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки).

Методы и результаты

Демография и анамнез

Пациенткой была белая девушка в возрасте 14 лет в момент начала лечения, которую в данном примере называют «получающей лечение из сострадания пациенткой № 1». Пациентка имела в анамнезе анемию Даймонда-Блэкфана и синдром пустого турецкого седла.

Исход для пациентки

Пациентка жива в день 877.

Заболевание, приводящее к необходимости трансплантации

Пациентка имела в анамнезе анемию Даймонда-Блэкфана. Девушка получала

необходимые инфузии эритроцитов каждые 3 недели с младенческого возраста, и ранее у нее развилась перегрузка железом.

Трансплантат

Пациентка получила трансплантат стволовых клеток в сентябре 2015 г. Девушка получила трансплантат PBSC от совпадающего на 9/10 неродственного донора. Приживление нейтрофилов произошло примерно к дню 35. Приживление тромбоцитов не было достигнуто к дню 184. Девушке были необходимы инфузии тромбоцитов и эритроцитов в течение срока более 1 года.

Осложнения после трансплантации

У пациентки было тяжелое пост-трансплантационное состояние. Вскоре после выписки девушка была вновь госпитализирована в день 67 из-за затрудненного дыхания и предполагаемой пневмонии. Она была выписана в день 162. Девушка была вновь госпитализирована в день 167 с реактивацией ветряной оспы, которую лечили ацикловиром, и полисерозитом, который лечили кортикостероидами. У нее была стойкая тромбоцитопения и анемия, повышенный уровень LDH, сниженный уровень гаптоглобина, шизоциты и отрицательные результаты прямого теста на антитела. Был поставлен диагноз TMA. Применение иммунодепрессантов изменили на MMF и преднизон. У нее также произошла реактивация HHV6 и EBV. Девушка была выписана в день 197.

В день 229 она вновь была госпитализирована со стойкой TMA и тяжелой дыхательной недостаточностью. У нее было диагностировано диффузное альвеолярное кровотечение, которое лечили CPAP и кортикостероидами. В день 231 у нее случился выпот в плевральной полости и перикарде с ухудшением оксигенации. Ее кровяное давление повысилось. Ей потребовалось введение ингибитора ACE, блокатора кальциевых каналов, бета-блокатора, диуретика и нитроглицерина для контроля кровяного давления. Она испытывала судороги, и дополнительно начали вводить клонидин. МРТ мозга показала железо в мозге, что согласовывалось с наличием вторичного гемохроматоза вследствие переливаний ей эритроцитов. Гемодиализ был начат в день 231. В день 259 она начала получать экулизумаб из-за продолжающейся почечной дисфункции и ухудшения легочного статуса. Ее показатели TMA улучшились, но у нее развился острый легочный отек, и введение экулизумаба прекратили. Ее показатели TMA ухудшились, и она получала плазмаферез в дни 269, 276 и 278, без улучшения. Она получала дефибротид, который был отменен из-за коагулопатии и отсутствия улучшения TMA. Она вновь начала получать низкую дозу экулизумаба, начиная примерно в день 320. Введение экулизумаба было вновь прекращено из-за легочного отека. TMA сохранялась. У девушки также развилась инфекция C. difficile. Она была выписана из больницы в день 379 и получала преднизон, MMF, вориконазол, клотримазол, амлодипин, эритропоэтин, урсодиол и омепразол.

Девушка была вновь госпитализирована в день 380 с лихорадкой, ознобом и диспноэ. У нее развилась вызванная K. pneumoniae пневмония и вызванный E. faecium

сепсис. Введение MMF было остановлено. Ее лечили тазоцином, меропенемом и ванкомицином. При стойкой бактериемии, ей сменили центральный катетер и заменили антибиотики на линезолид, даптомицин и клиндамицин. Ее TMA сохранялась, что создавало необходимость в гемодиализе 3 раза в неделю и ежедневном переливании тромбоцитарной массы. Легочный отек был диагностирован как диффузное альвеолярное кровотечение (которое лечили кортикостероидами, но безрезультатно). В день 404 было начато лечение OMS646 из сострадания. Как описано в настоящем документе, OMS646 представляет собой ингибирующее MASP-2 антитело, которое ингибирует лектиновый путь активации комплемента.

Девушке вводили 3 раза в неделю дозу 4 мг/кг OMS646. Ингаляторное введение кислорода ей было прекращено, и доза кортикостероидов для нее была снижена. Ее лабораторные маркеры TMA улучшились. Она была выписана в день 414.

Она продолжала амбулаторное лечение OMS646 3 раза в неделю, и в день 416 гемодиализ для нее был сокращен до одного раза в неделю. Список принимаемых ею антигипертензивных препаратов был сокращен до амлодипина, клонидина и фуросемида. В день 423 она смогла прекратить гемодиализ, и в день 428 введение ей OMS646 было сокращено до двух раз в неделю, с уменьшением принимаемых ею доз кортикостероидов и фуросемида. Переливание ей тромбоцитарной массы было значительно сокращено в течение этого периода.

Ее состояние улучшалось до дня 486, когда у нее развилась инфекция RSV. Уровни креатинина и LDH у нее повысились, а количества тромбоцитов и гаптоглобина упали. У нее была диагностирована рецидивирующая TMA, и введение OMS646 было увеличено до 3 раз в неделю. Ее TMA прекратилась с увеличением количества введений OMS646.

Девушка больше не получала гемодиализ, и ее последнее переливание тромбоцитарной массы было проведено примерно в день 630. В настоящее время она чувствует себя неплохо и получает OMS646, дезферриоксамин, левотироксин, севеламер, аугментин, леветирацетам, аллопуринол, амлодипин, небиволол, клонидин и эритропоэтин. Ей проводят флеботомию из-за гемохроматоза.

Эпизоды TMA

У данной пациентки было тяжелое состояние со стойкой и/или рецидивирующей TMA. Течение ее заболевания соответствовало полиорганной TMA, и у нее было диффузное альвеолярное кровотечение (DAH), другой синдром эндотелиального повреждения. Она сначала отвечала на экулизумаб, но не переносила лечение. Перед началом лечения OMS646 она получала гемодиализ, и ей требовались ежедневное переливание крови. Вскоре после начала лечения OMS646 ее TMA прекратилась, ее DAH прекратилось, и она смогла прекратить диализ. Позже для нее стало возможно значительно сократить, а еще позже прекратить, переливание тромбоцитов и эритроцитов, с поддержанием стабильных или увеличивающихся уровней тромбоцитов и гемоглобина. Эти результаты представлены на ФИГУРАХ 62A-62E следующим образом:

На ФИГУРЕ 62A приведен график, показывающий уровень креатинина в

зависимости от времени при лечении из сострадания пациентки № 1, где вертикальная линия отмечает начало лечения ингибирующим MASP-2 антителом (OMS646).

На ФИГУРЕ 62B приведен график, показывающий уровень гаптоглобина в зависимости от времени при лечении из сострадания пациентки № 1, где вертикальная линия отмечает начало лечения ингибирующим MASP-2 антителом (OMS646).

На ФИГУРЕ 62C приведен график, показывающий уровень гемоглобина в зависимости от времени при лечении из сострадания пациентки № 1, где вертикальная линия отмечает начало лечения ингибирующим MASP-2 антителом (OMS646).

На ФИГУРЕ 62D приведен график, показывающий уровень LDH в зависимости от времени при лечении из сострадания пациентки № 1, где вертикальная линия отмечает начало лечения ингибирующим MASP-2 антителом (OMS646).

На ФИГУРЕ 62E приведен график, показывающий уровень тромбоцитов в зависимости от времени при лечении из сострадания пациентки № 1, где вертикальная линия отмечает начало лечения ингибирующим MASP-2 антителом (OMS646).

В целом, клиническая ситуация данной пациентки показывает успешное лечение TMA и DAH при помощи OMS646, что позволило пациентке прекратить кислородную терапию, гемодиализ и переливания крови.

Резюме

Подводя итог, в данном примере описан клинический случай HCST-TMA у девушки-подростка (получающей лечение из сострадания пациентки № 1), которая не переносила введение экулизумаба, но хорошо отвечала на применяемое из сострадания лечение OMS646. Вскоре после начала лечения OMS646 ее TMA прекратилась, ее DAH прекратилось, и ей можно было прекратить диализ. В примере 47 описан другой клинический случай HSCT-TMA у пациента с тяжелым состоянием после трансплантации, включающим резистентную к стероидам GvHD и цитомегаловирусную инфекцию. У него развилась TMA, которая не поддавалась лечению консервативными методами, и одновременно развилась GvHD с множественными неврологическими осложнениями, из-за которых он не мог ходить. Как описано в примере 47, после лечения OMS646 его TMA и GvHD прекратились, и его неврологические осложнения уменьшились. Он смог вернуться к работе, и его неврологический статус продолжал улучшаться.

Улучшение показателей общей выживаемости и маркеров TMA у реципиентов HSCT, в сочетании с разрешением GvHD и разрешением диффузного альвеолярного кровотечения, у этих тяжело больных пациентов указывает на роль, которую лектиновый путь играет в этих заболеваниях, а также на эффективность использования ингибирующего MASP-2 антитела OMS646 в лечении и/или предотвращении TMA вследствие трансплантации стволовых клеток, реакции трансплантат против хозяина и диффузного альвеолярного кровотечения.

В соответствии с вышеизложенным, в одном варианте осуществления изобретение относится к способу лечения субъекта-человека, страдающего от диффузного альвеолярного кровотечения, связанного с трансплантатом гемопоэтических стволовых

клеток (то есть, реципиента HSCT), включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает идентификацию субъекта-человека, страдающего от диффузного альвеолярного кровотечения, связанного с HSCT, перед этапом введения субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента.

В соответствии с любым из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело имеет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческий MASP-2 с величиной K_D, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в домене CCP1 MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в in vitro анализе в 1% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее, при этом антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', $F(ab)_2$ и $F(ab')_2$, при этом антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG2, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, при этом молекула IgG4 имеет мутацию S228P. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не ингибирует классический путь (то есть, ингибирует лектиновый путь, не затрагивая классический путь комплемента).

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят в количестве, эффективном для улучшения по меньшей мере одного или более клинических параметров, ассоциированных с диффузным альвеолярным кровотечением у реципиента HSCT. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ингибирующего MASP-2 антитела субъекту, страдающему от диффузного альвеолярного кровотечения, внутривенно, внутримышечно или подкожно. Лечение может быть хроническим и применяться ежедневно или ежемесячно, но, предпочтительно, по меньшей мере каждые две недели, или по меньшей мере один раз в неделю, например, два раза в неделю или три раза в неделю. Ингибирующее MASP-2 антитело можно вводить отдельно или в сочетании с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

В одном варианте осуществления способ включает лечение субъекта, страдающего от диффузного альвеолярного кровотечения, связанного с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, включающее введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-

L3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит ингибирующее MASP-2 антитело, содержащее (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: i) CDR-H1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 31-35 в SEQ ID NO: 67; и ii) CDR-H2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-65 в SEQ ID NO: 67; и iii) CDR-H3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 95-107 в SEQ ID NO: 67, и b) вариабельную область легкой цепи, содержащую: i) CDR-L1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 24-34 в SEQ ID NO: 70; и ii) CDR-L2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-56 в SEQ ID NO: 70; и iii) CDR-L3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 89-97 в SEQ ID NO: 70, или (II) его вариант, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67), и вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически узнает по меньшей мере часть эпитопа на человеческом MASP-2, узнаваемого эталонным антителом OMS646, содержащим вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту, страдающему от, или имеющему риск развития, диффузного альвеолярного кровотечения, связанного с HSCT, композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, в дозе от 1 мг/кг до 10 мг/кг (то есть, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг или 10 мг/кг) по меньшей мере один раз в неделю (например, по меньшей мере два раза в неделю или по меньшей мере три раза в неделю) в течение

периода времени по меньшей мере 3 недели или по меньшей мере 4 недели, или по меньшей мере 5 недель, или по меньшей мере 6 недель, или по меньшей мере 7 недель, или по меньшей мере 8 недель.

В соответствии с вышеизложенным, в другом варианте осуществления изобретение относится к способу лечения субъекта-человека, страдающего от веноокклюзионной болезни (VOD), связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток (то есть, реципиента HSCT), включающему введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает идентификацию субъекта-человека, страдающего от веноокклюзионной болезни, связанной с HSCT, перед этапом введения субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента.

В соответствии с любым из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления ингибирующее MASP-2 антитело имеет по меньшей мере одну или более из следующих характеристик: указанное антитело связывает человеческий MASP-2 с величиной K_D, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело связывает эпитоп в домене CCP1 MASP-2, указанное антитело ингибирует отложение C3b в in vitro анализе в 1% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 10 нМ или менее, указанное антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее, при этом антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', $F(ab)_2$ и $F(ab')_2$, при этом антитело представляет собой одноцепочечную молекулу, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG2, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG1, при этом указанное антитело представляет собой молекулу IgG4, при этом молекула IgG4 имеет мутацию S228P. В одном варианте осуществления антитело связывает MASP-2, избирательно ингибирует лектиновый путь и существенно не ингибирует классический путь (то есть, ингибирует лектиновый путь, не затрагивая классический путь комплемента).

В одном варианте осуществления ингибирующее MASP-2 антитело вводят в количестве, эффективном для улучшения по меньшей мере одного или более клинических параметров, ассоциированных с веноокклюзионной болезнью, у реципиента HSCT. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ингибирующего MASP-2 антитела субъекту, страдающему от веноокклюзионной болезни, внутривенно, внутримышечно или подкожно. Лечение может быть хроническим и применяться ежедневно или ежемесячно, но, предпочтительно, по меньшей мере каждые две недели, или по меньшей мере один раз в неделю, например, два раза в неделю или три раза в неделю. Ингибирующее MASP-2 антитело можно вводить отдельно или в сочетании с ингибитором C5, таким как экулизумаб.

В одном варианте осуществления способ включает лечение субъекта, страдающего

от веноокклюзионной болезни, связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, включающее введение субъекту композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит ингибирующее MASP-2 антитело, содержащее (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: i) CDR-H1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 31-35 в SEQ ID NO: 67; и ii) CDR-H2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-65 в SEQ ID NO: 67; и iii) CDR-H3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 95-107 в SEQ ID NO: 67, и b) вариабельную область легкой цепи, содержащую: i) CDR-L1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 24-34 в SEQ ID NO: 70; и ii) CDR-L2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 50-56 в SEQ ID NO: 70; и iii) CDR-L3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность остатков 89-97 в SEQ ID NO: 70, или (II) его вариант, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67 (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 67), и вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту, страдающему от веноокклюзионной болезни, связанной с HSCT, композиции, содержащей определенное количество ингибирующего MASP-2 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически узнает по меньшей мере часть эпитопа на человеческом MASP-2, узнаваемого эталонным антителом OMS646, содержащим вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту, страдающему от, или имеющему риск развития, веноокклюзионной болезни, связанной с HSCT, композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его

антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, в дозе от 1 мг/кг до 10 мг/кг (то есть, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг или 10 мг/кг) по меньшей мере один раз в неделю (например, по меньшей мере два раза в неделю или по меньшей мере три раза в неделю) в течение периода времени по меньшей мере 3 недели или по меньшей мере 4 недели, или по меньшей мере 5 недель, или по меньшей мере 6 недель, или по меньшей мере 7 недель, или по меньшей мере 8 недель.

При том, что иллюстративные варианты осуществления были проиллюстрированы и описаны, следует понимать, что могут быть произведены различные изменения без отклонения от сущности и объема настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Заявленные варианты осуществления изобретения, в отношении которых испрашивается исключительное право собственности и привилегия, являются следующими:

1. Способ лечения субъекта-человека, страдающего от, или имеющего риск развития, реакции трансплантат против хозяина (GVHD), включающий введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента.

2. Способ по п. 1, при этом ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой моноклональное антитело, или его фрагмент, которое специфически связывает человеческий MASP-2.

3. Способ по п. 1, при этом антитело, или его фрагмент, выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела, имеющего сниженную эффекторную функцию, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела.

4. Способ по п. 1, при этом ингибирующее MASP-2 антитело существенно не ингибирует классический путь.

5. Способ по п. 1, при этом ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее.

6. Способ по п. 1, при этом ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту системно.

7. Способ по п. 1, дополнительно включающий идентификацию субъекта-человека, страдающего от, или имеющего риск развития, реакции трансплантат против хозяина, перед этапом введения субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента.

8. Способ по п. 1, при этом субъект получал ранее, или получает в настоящее время, или будет получать, трансплантат гемопоэтических стволовых клеток.

9. Способ по п. 1, при этом субъект страдает от острой GVHD.

10. Способ по п. 1, при этом субъект страдает от хронической GVHD.

11. Способ по п. 1, при этом субъект страдает от резистентной к стероидам GVHD.

12. Способ по п. 1, при этом ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70.

13. Способ по любому из пунктов 1-12, включающий введение субъекту композиции, содержащей указанное ингибирующее MASP-2 антитело, в дозе от 1 мг/кг до 10 мг/кг по меньшей мере один раз в неделю.

14. Способ лечения, предотвращения или облегчения одного или более неврологических симптомов, связанных с реакцией трансплантат против хозяина или HSCT-TMA, включающий введение субъекту до, в процессе, или после получения трансплантата гемопоэтических стволовых клеток композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента.

15. Способ по п. 14, при этом один или более неврологических симптомов, связанных с реакцией трансплантат против хозяина или HSCT-TMA, выбирают из группы, состоящей из астении, парестезии, тетраплегии, сенсорно-двигательных нарушений, вегето-сосудистой полиневропатии и/или нейрогенного мочевого пузыря.

16. Способ по п. 14, при этом субъект получил трансплантат гемопоэтических стволовых клеток и субъект страдает от одного или более неврологических симптомов, выбранных из группы, состоящей из астении, парестезии, тетраплегии, сенсорно-двигательных нарушений, вегето-сосудистой полиневропатии и/или нейрогенного мочевого пузыря.

17. Способ по любому из пунктов 14-16, при этом субъект получил трансплантат гемопоэтических стволовых клеток и страдает от реакции трансплантат против хозяина.

18. Способ по любому из пунктов 14-17, при этом субъект получил трансплантат гемопоэтических стволовых клеток и страдает от HSCT-TMA.

19. Способ по п. 14, при этом ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой моноклональное антитело, или его фрагмент, которое специфически связывает человеческий MASP-2.

20. Способ по п. 14, при этом антитело, или его фрагмент, выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела, имеющего сниженную эффекторную функцию, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела.

21. Способ по п. 14, при этом ингибирующее MASP-2 антитело существенно не ингибирует классический путь.

22. Способ по п. 14, при этом ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее.

23. Способ по п. 14, при этом ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту системно.

24. Способ по п. 14, дополнительно включающий идентификацию субъекта-человека, страдающего от одного или более неврологических симптомов, связанных с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, перед этапом введения субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента.

25. Способ по п. 14, при этом ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит вариабельную область тяжелой цепи,

содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70.

26. Способ лечения субъекта-человека, страдающего от, или имеющего риск развития, диффузного альвеолярного кровотечения, включающий введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента.

27. Способ по п. 26, при этом ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой моноклональное антитело, или его фрагмент, которое специфически связывает человеческий MASP-2.

28. Способ по п. 26, при этом антитело, или его фрагмент, выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела, имеющего сниженную эффекторную функцию, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела.

29. Способ по п. 26, при этом ингибирующее MASP-2 антитело существенно не ингибирует классический путь.

30. Способ по п. 26, при этом ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее.

31. Способ по п. 26, при этом ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту системно.

32. Способ по п. 26, дополнительно включающий идентификацию субъекта-человека, страдающего от, или имеющего риск развития, диффузного альвеолярного кровотечения, перед этапом введения субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента.

33. Способ по п. 26, при этом субъект получал ранее, или получает в настоящее время, или будет получать, трансплантат гемопоэтических стволовых клеток.

34. Способ по п. 26, при этом ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70.

35. Способ по любому из пунктов 26-34, при этом субъект получил трансплантат гемопоэтических стволовых клеток и страдает от диффузного альвеолярного кровотечения.

36. Способ лечения субъекта-человека, страдающего от, или имеющего риск развития, веноокклюзионной болезни, включающий введение субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента.

37. Способ по п. 36, при этом ингибирующее MASP-2 антитело представляет собой моноклональное антитело, или его фрагмент, которое специфически связывает человеческий MASP-2.

38. Способ по п. 36, при этом антитело, или его фрагмент, выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела, имеющего сниженную эффекторную функцию, химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела.

39. Способ по п. 36, при этом ингибирующее MASP-2 антитело существенно не ингибирует классический путь.

40. Способ по п. 36, при этом ингибирующее MASP-2 антитело ингибирует отложение C3b в 90% человеческой сыворотке с величиной IC_{50}, составляющей 30 нМ или менее.

41. Способ по п. 36, при этом ингибирующее MASP-2 антитело вводят субъекту системно.

42. Способ по п. 36, дополнительно включающий идентификацию субъекта-человека, страдающего от, или имеющего риск развития, веноокклюзионной болезни, перед этапом введения субъекту композиции, содержащей ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в количестве, эффективном для ингибирования MASP-2-зависимой активации комплемента.

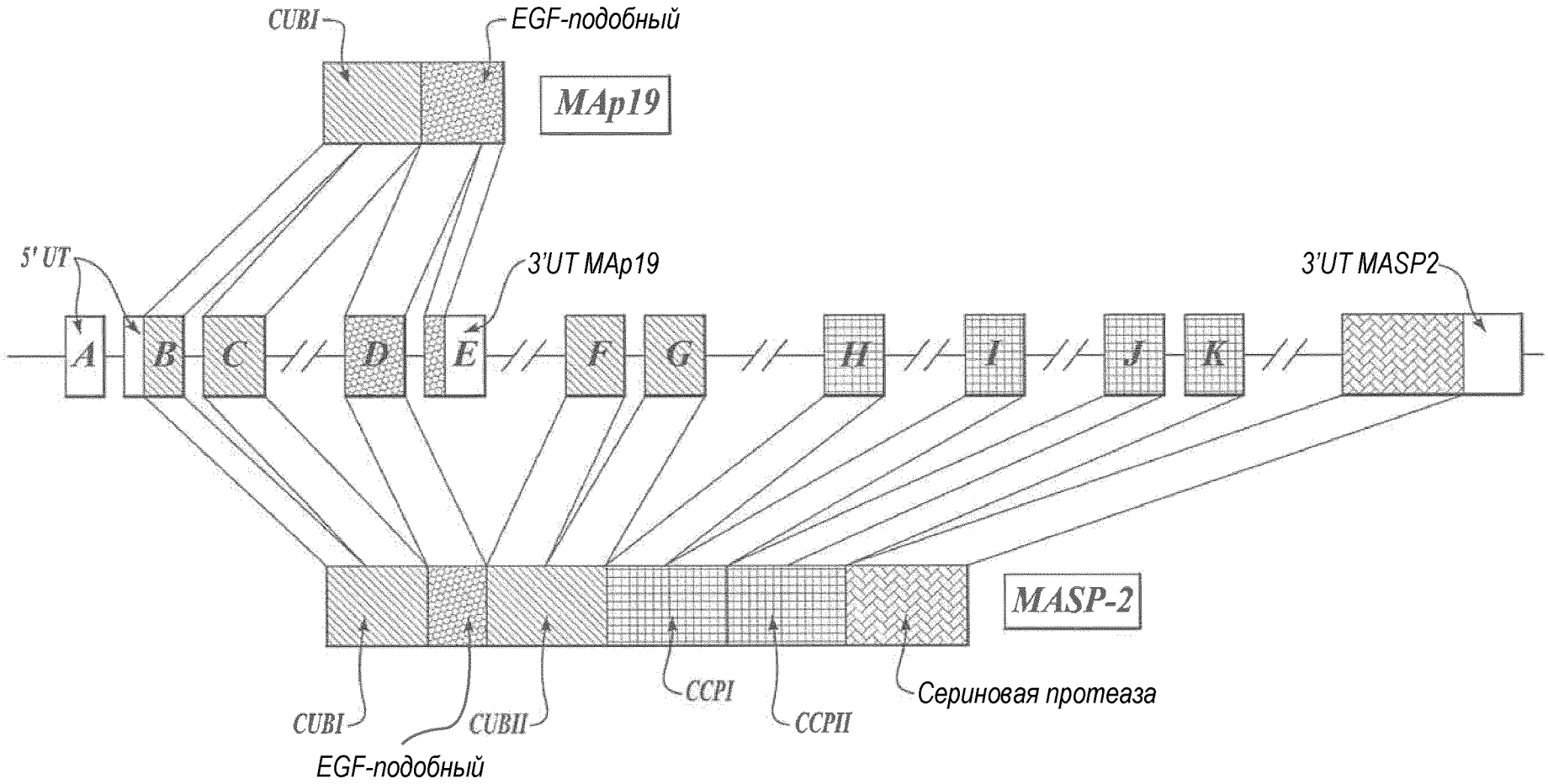
43. Способ по п. 36, при этом субъект получал ранее, или получает в настоящее время, или будет получать, трансплантат гемопоэтических стволовых клеток.

44. Способ по п. 36, при этом ингибирующее MASP-2 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70.

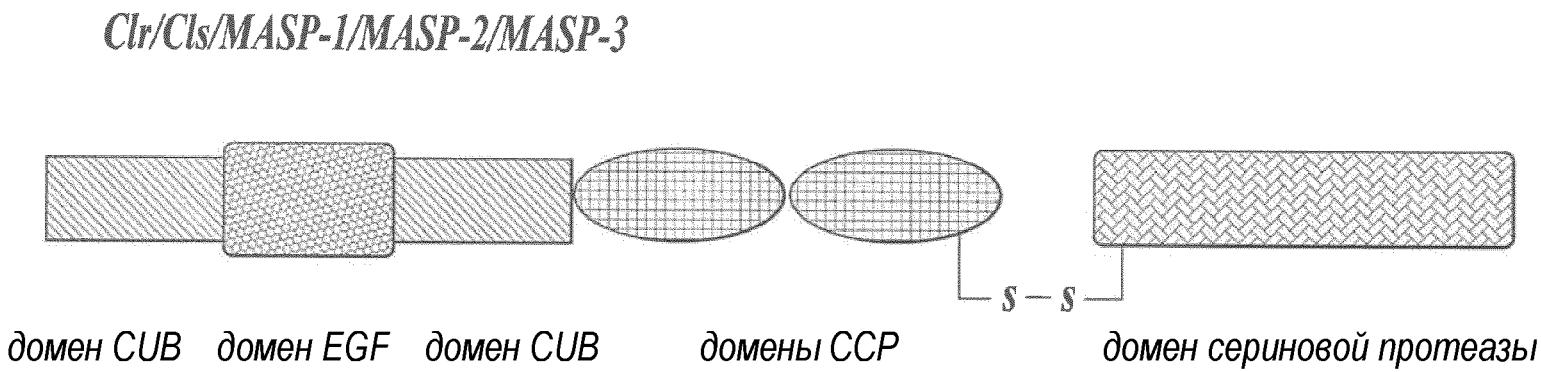
45. Способ по любому из пунктов 36-44, при этом субъект получил трансплантат гемопоэтических стволовых клеток и страдает от веноокклюзионной болезни.

По доверенности

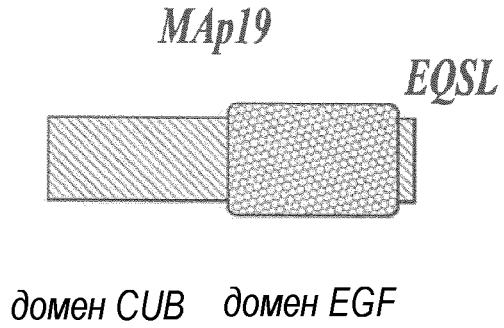
ФИГ.1


CUBI
EGF-подобный
MAp19
5' UT
3'UT MAp19
3'UT MASP2
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
MASP-2
CUBI
CUBII
EGF-подобный
CCPI
CCPII
Сериновая протеаза

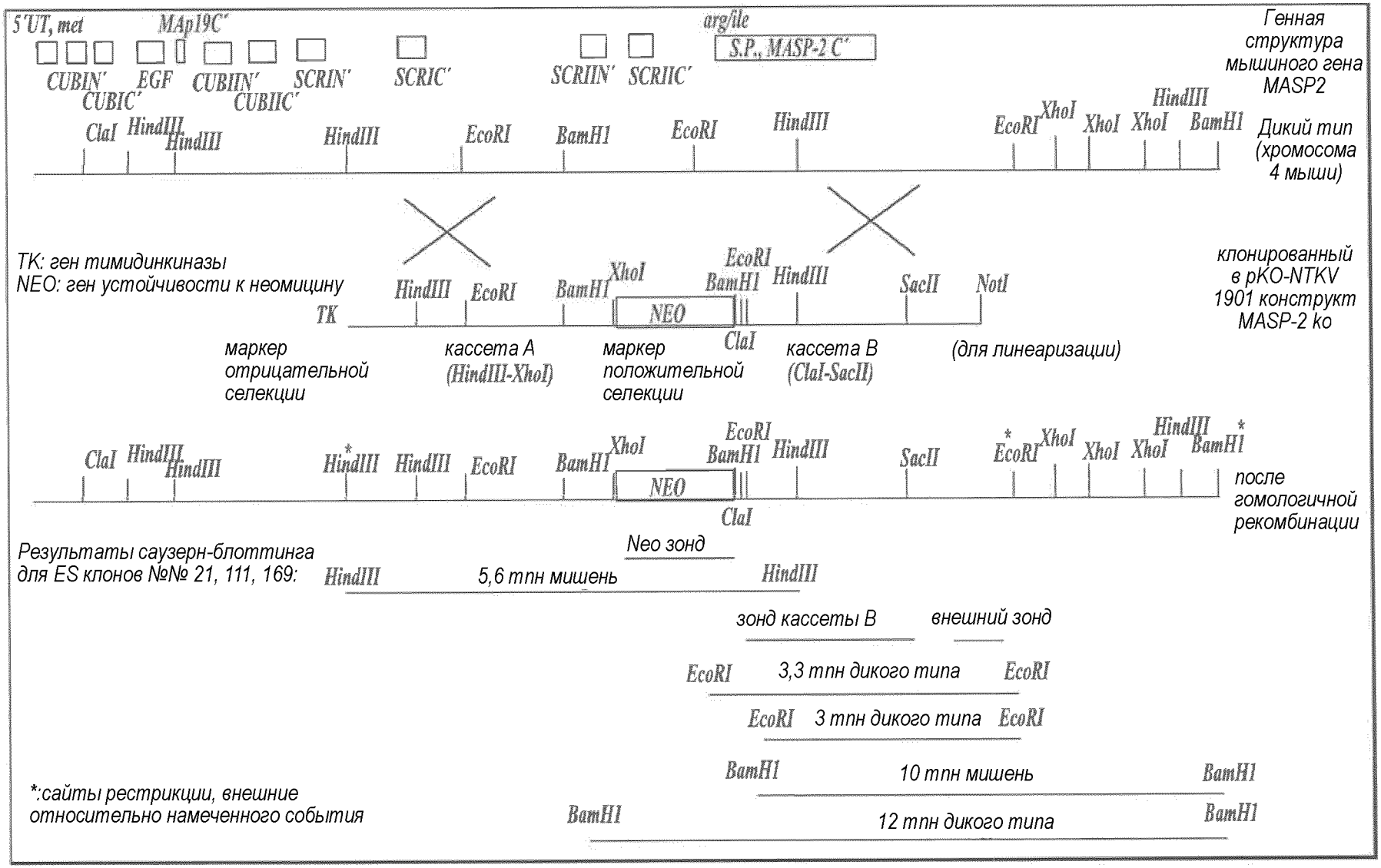
ФИГ.2А


Clr/Cls/MASP-1/MASP-2/MASP-3
S — S
домен CUB
домен EGF
домен CUB
домены CCP
домен сериновой протеазы

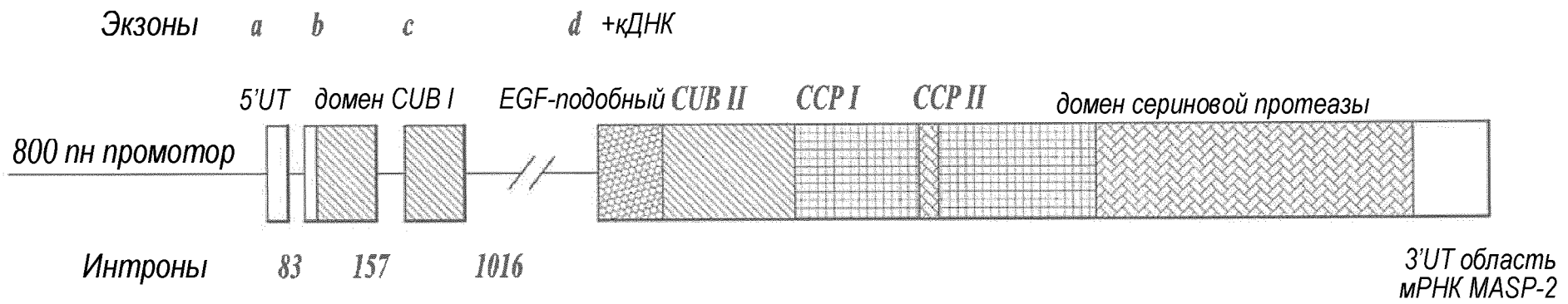
ФИГ.2В


MAp19
EQSL
домен CUB
домен EGF

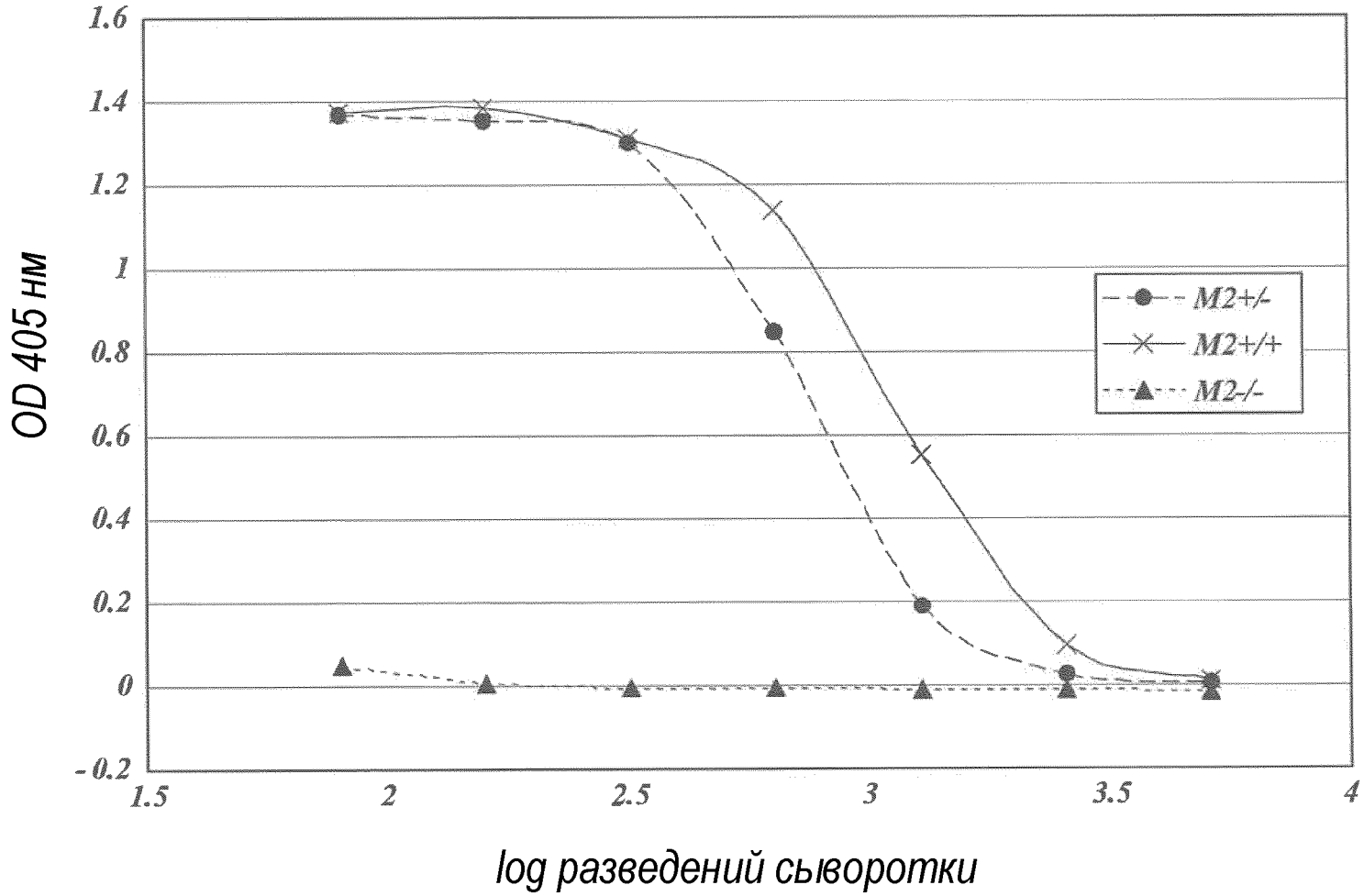
ФИГ.3


5'UT, met
MAp19C'
arg/ile
S.P., MASP-2 C'
CUBIN'
CUBIC'
EGF
CUBIIN'
CUBIIC'
SCRIN'
SCRIC'
SCRIIN'
SCRIIC'
Генная структура мышиного гена MASP2
ClaI
HindIII
HindIII
HindIII
EcoRI
BamH1
EcoRI
HindIII
EcoRI
XhoI
XhoI
XhoI
HindIII
BamH1
Дикий тип (хромосома 4 мыши)
TK: ген тимидинкиназы
NEO: ген устойчивости к неомицину
TK
HindIII
EcoRI
BamH1
XhoI
NEO
EcoRI
BamH1
HindIII
SacII
NotI
ClaI
клонированный в pKO-NTKV 1901 конструкт MASP-2 ko
маркер отрицательной селекции
кассета A (HindIII-XhoI)
маркер положительной селекции
кассета B (ClaI-SacII)
(для линеаризации)
ClaI
HindIII
HindIII
HindIII
HindIII
EcoRI
BamH1
XhoI
NEO
EcoRI
BamH1
HindIII
SacII
EcoRI
XhoI
XhoI
XhoI
HindIII
BamH1
ClaI
после гомологичной рекомбинации
Результаты саузерн-блоттинга для ES клонов №№ 21, 111, 169:
Neo зонд
HindIII
5,6 тпн мишень
HindIII
зонд кассеты B
внешний зонд
EcoRI
3,3 тпн дикого типа
EcoRI
EcoRI
3 тпн дикого типа
EcoRI
BamH1
10 тпн мишень
BamH1
*:сайты рестрикции, внешние относительно намеченного события
BamH1
12 тпн дикого типа
BamH1

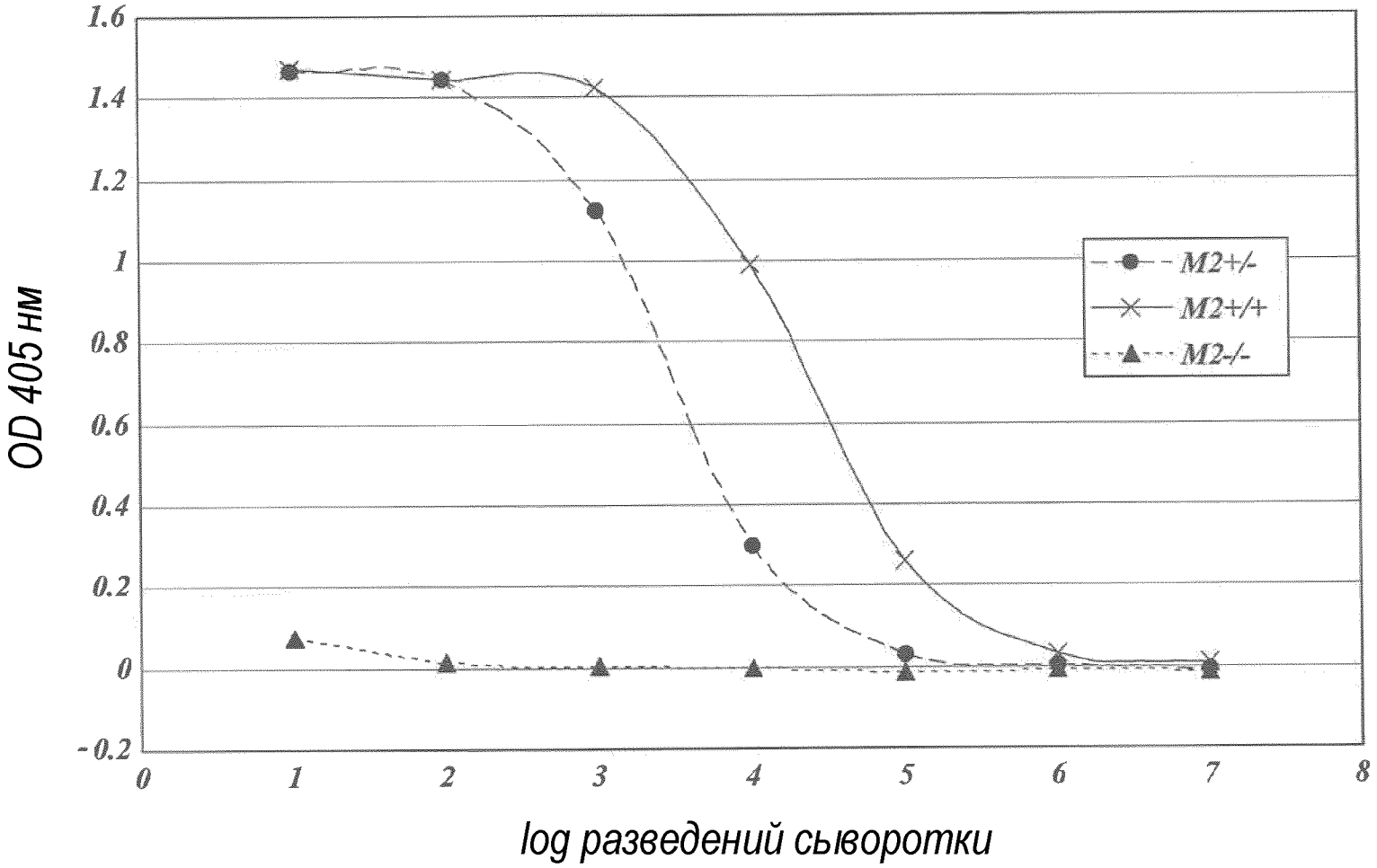
ФИГ.4


Экзоны a b c d +кДНК
5'UT
домен CUB I
EGF-подобный
CUB II
CCP I
CCP II
домен сериновой протеазы
800 пн промотор
Интроны 83 157 1016
3'UT область
мРНК MASP-2

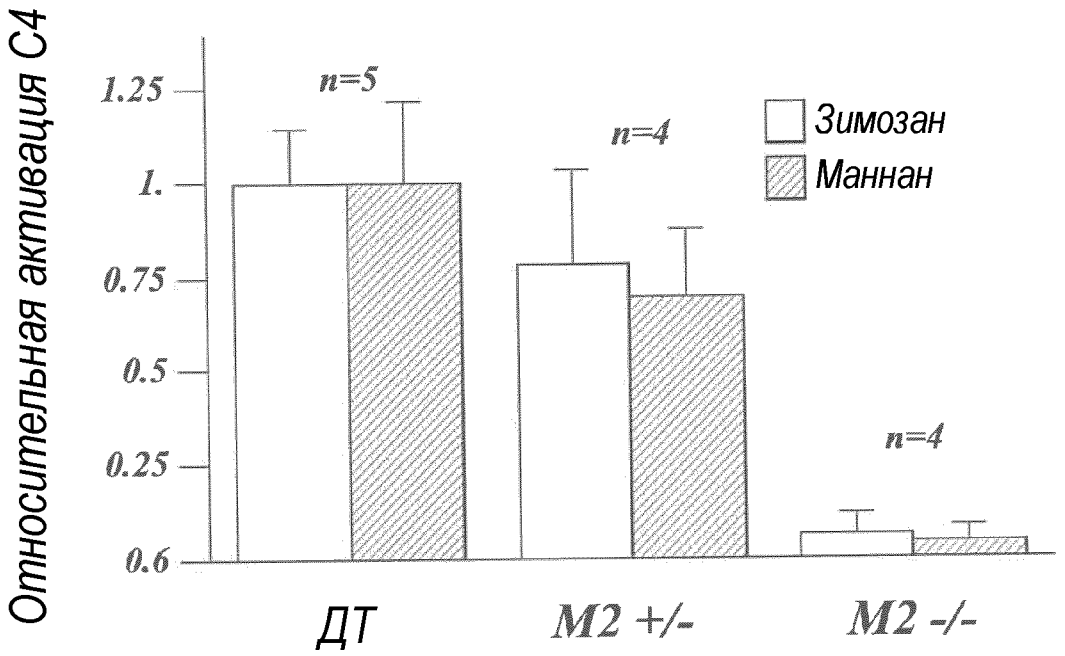
ФИГ.5А


1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
OD 405 нм
1.5
2
2.5
3
3.5
4
log разведений сыворотки
M2+/-
M2+/+
M2-/-

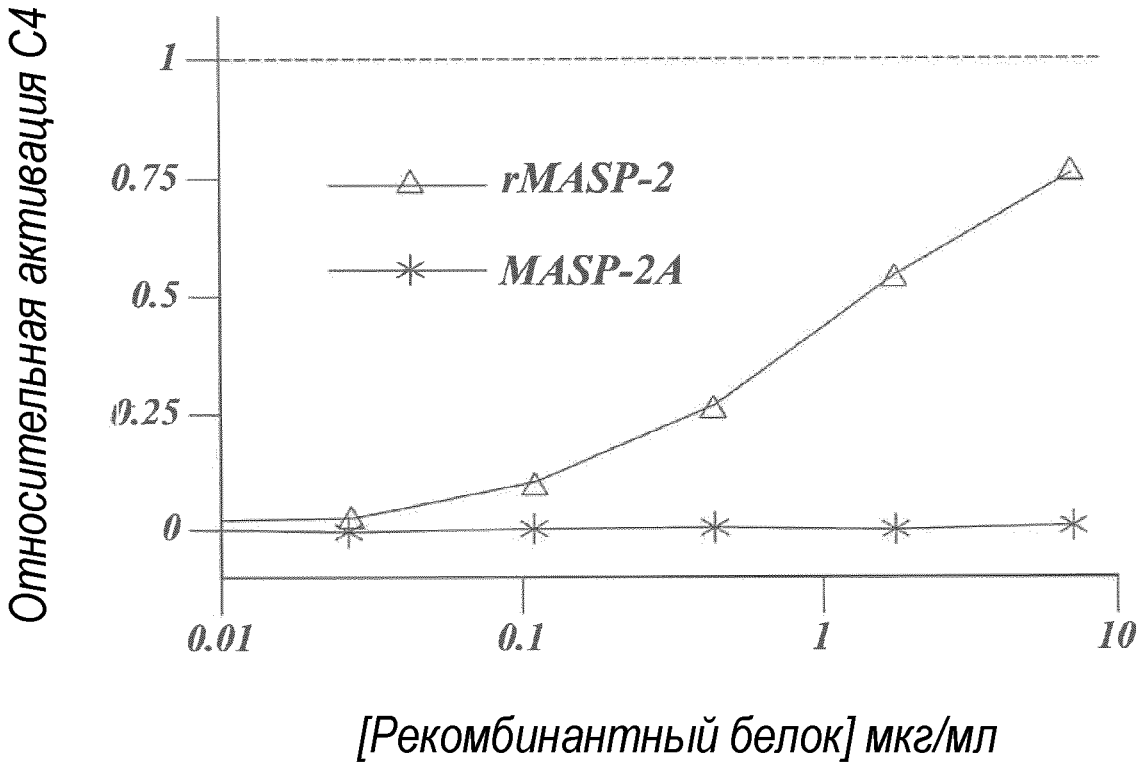
ФИГ.5В


1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
OD 405 нм
0
1
2
3
4
5
6
7
8
log разведений сыворотки
M2+/-
M2+/+
M2-/-

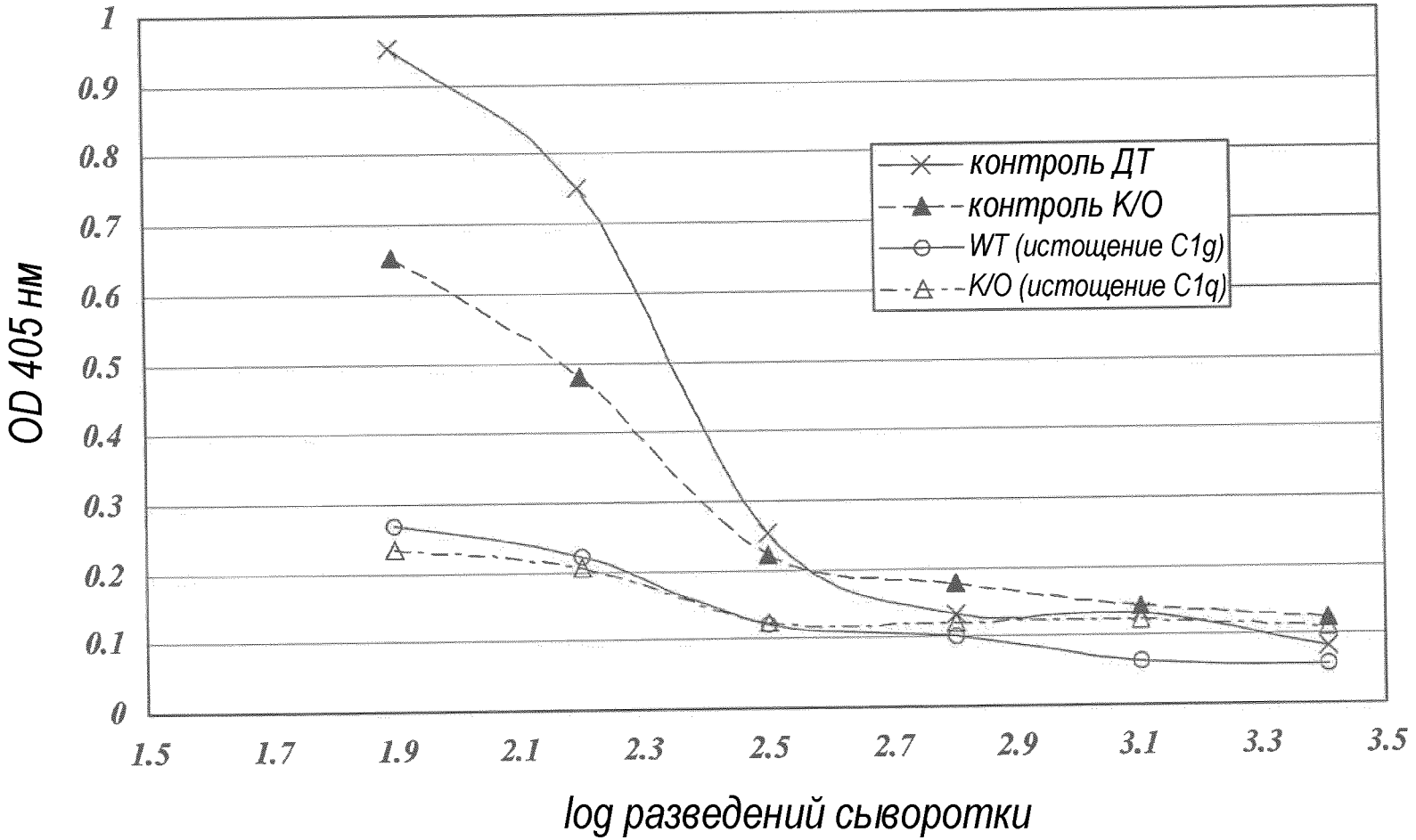
ФИГ.5С


Относительная активация С4
1.25
1.
0.75
0.5
0.25
0.6
n=5
n=4
n=4
Зимозан
Маннан
ДТ
M2 +/-
M2 -/-

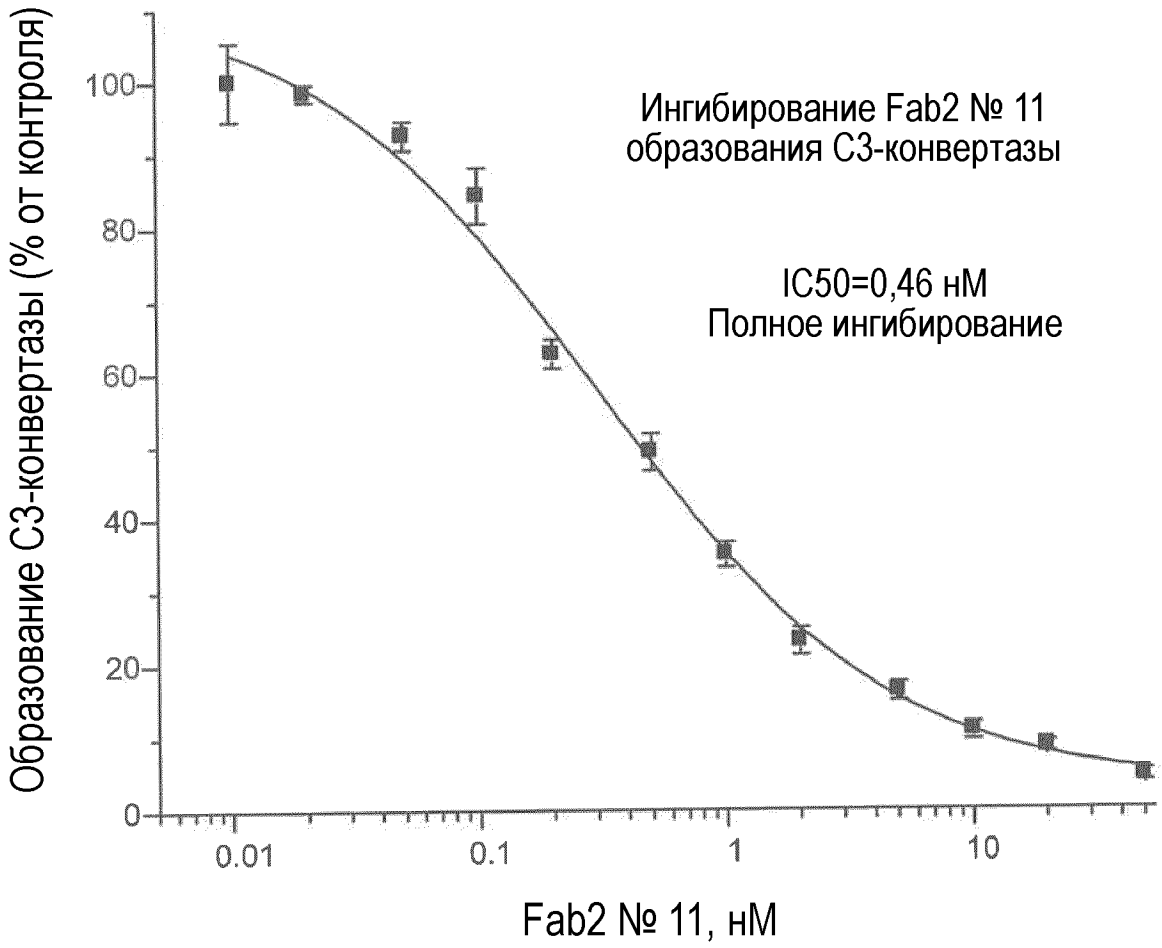
ФИГ.6


Относительная активация C4
1
0.75
0.5
0.25
0
rMASP-2
MASP-2A
0.01
0.1
1
10
[Рекомбинантный белок] мкг/мл

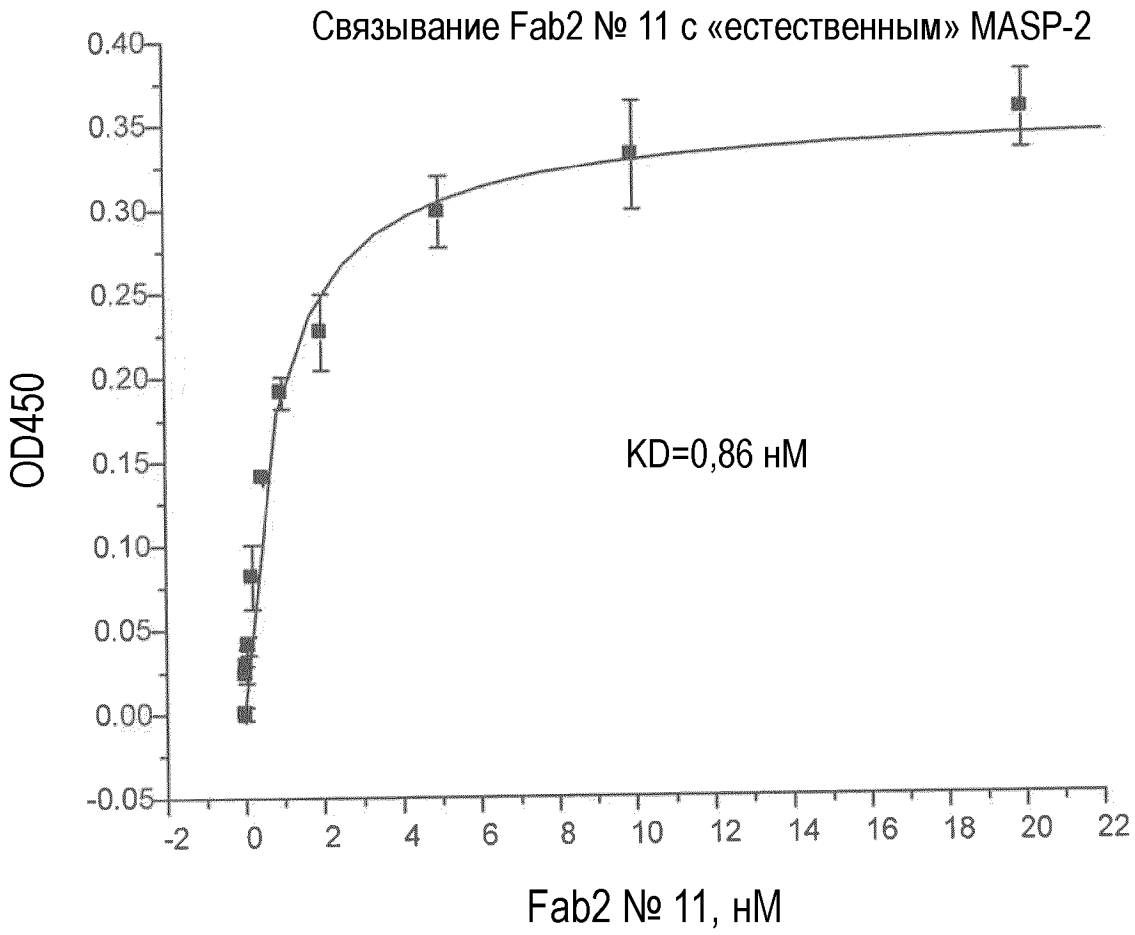
ФИГ.7


1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
OD 405 нм
1.5
1.7
1.9
2.1
2.3
2.5
2.7
2.9
3.1
3.3
3.5
log разведений сыворотки
контроль ДТ
контроль K/O
WT (истощение C1g)
K/O (истощение C1q)

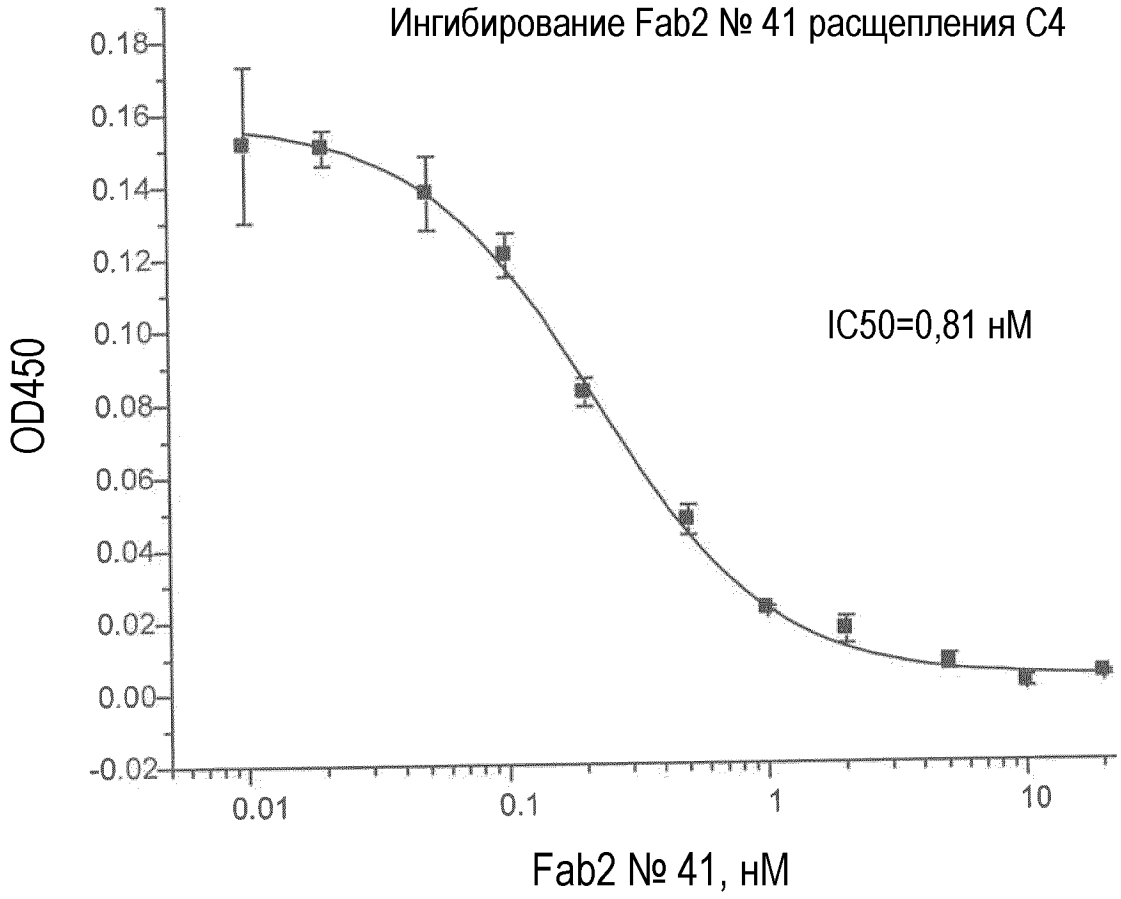
ФИГ.8А


Образование С3-конвертазы (% от контроля)
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
Fab2 № 11, нМ
Ингибирование Fab2 № 11
образования С3-конвертазы
IC50=0,46 нМ
Полное ингибирование

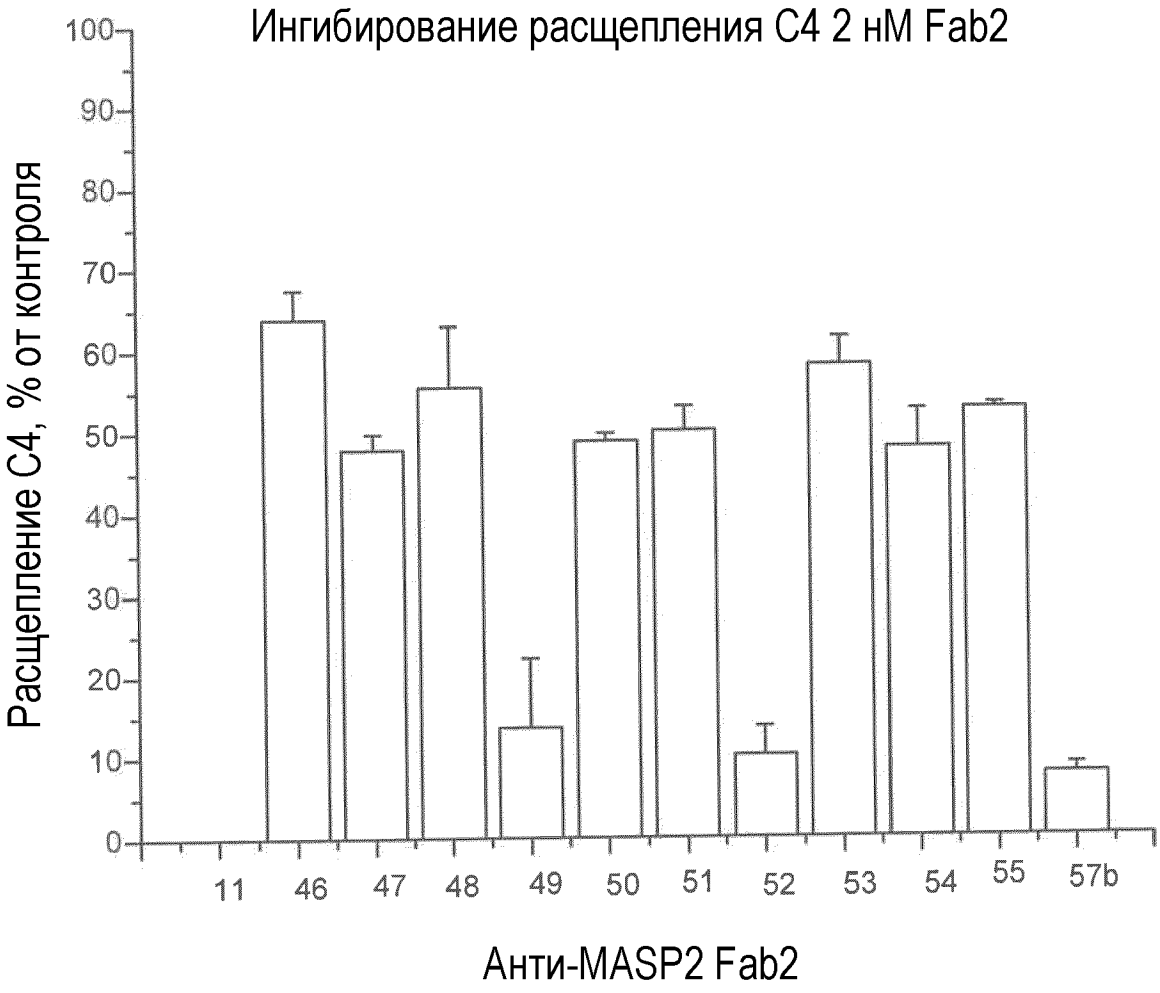
ФИГ.8В


Связывание Fab2 № 11 с «естественным» MASP-2
OD450
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
-0.05
-2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
KD=0,86 нМ
Fab2 № 11, нМ

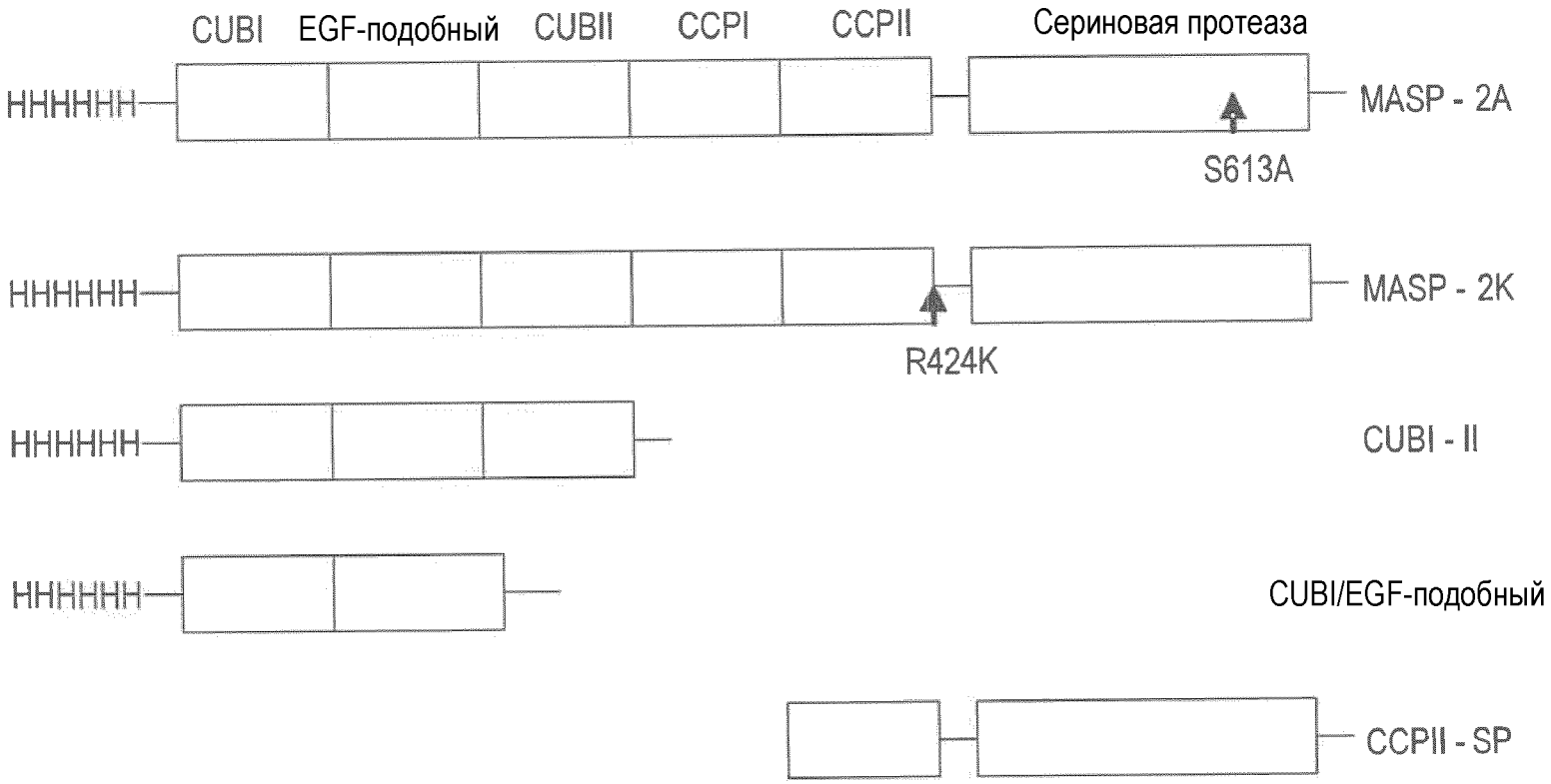
ФИГ.8С


Ингибирование Fab2 № 41 расщепления C4
IC50=0,81 нМ
OD450
0.18
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
-0.02
0.01
0.1
1
10
Fab2 № 41, нМ

ФИГ.9

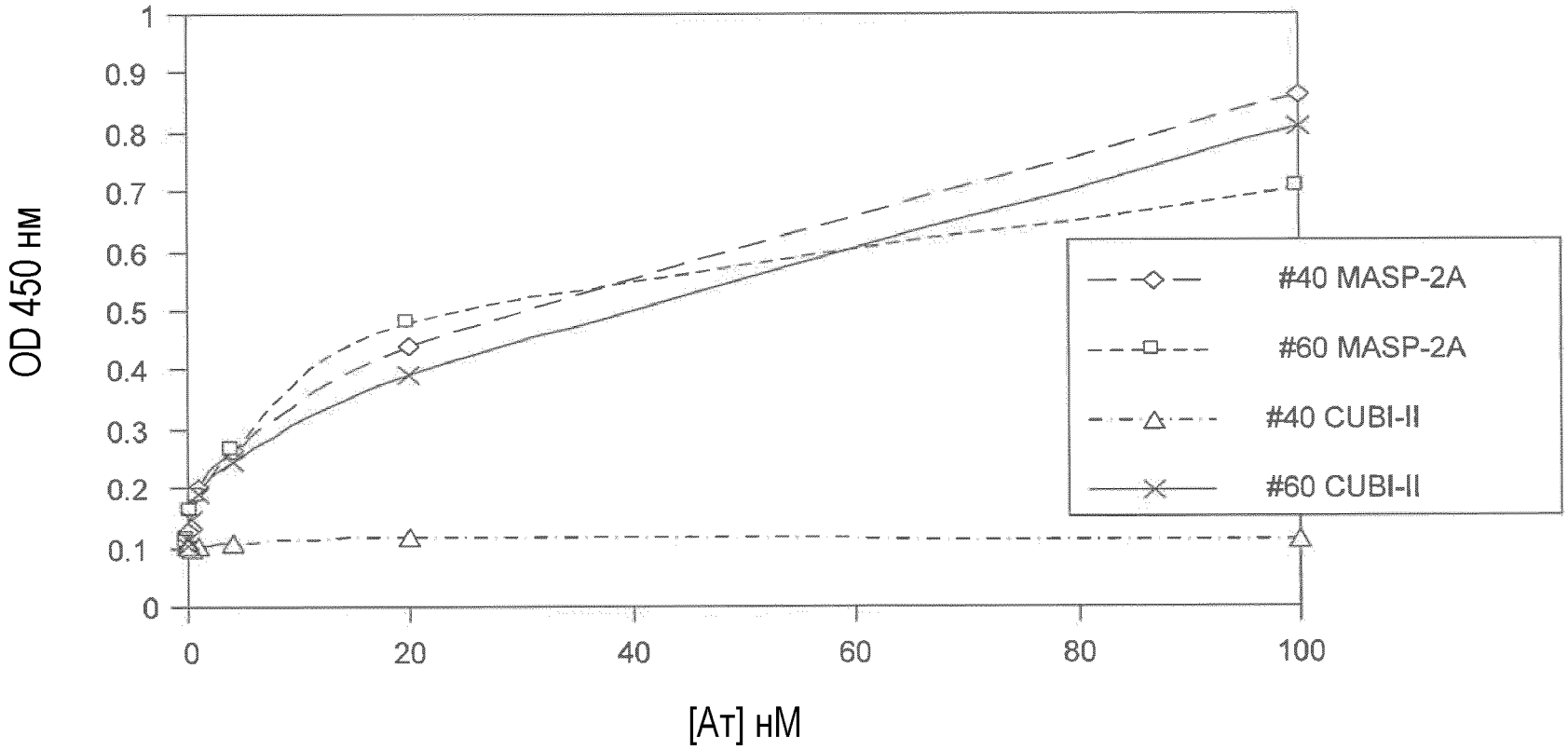

Ингибирование расщепления C4 2 нМ Fab2
Расщепление C4, % от контроля
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
11
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
57b
Анти-MASP2 Fab2

ФИГ.10

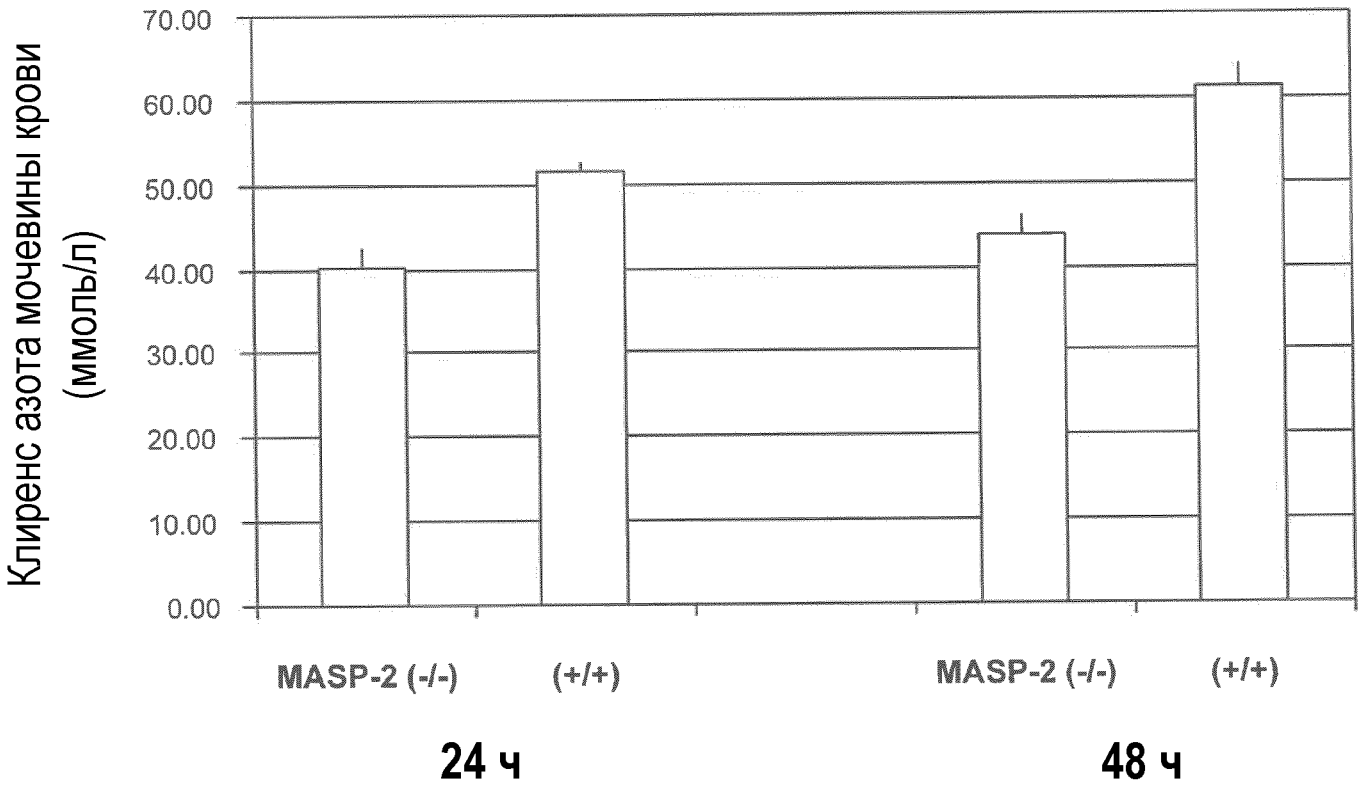

CUBI
EGF-подобный
CUBII
CCPI
CCPII
Сериновая протеаза
HHHHHH
MASP - 2A
S613A
HHHHHH
MASP - 2K
R424K
HHHHHH
CUBI - II
HHHHHH
CUBI/EGF-подобный
CCPII - SP

ФИГ.11

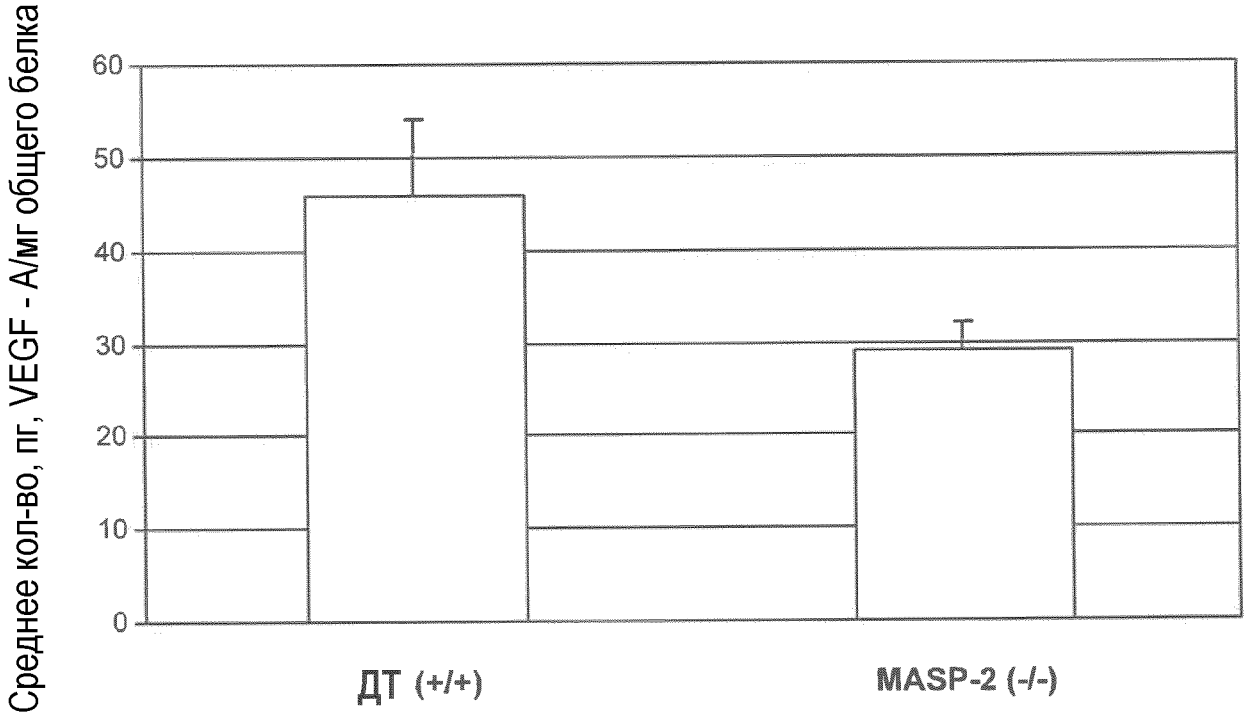
Связывание AbD Ат № 40 и № 60 с полипептидами крысиного MASP2



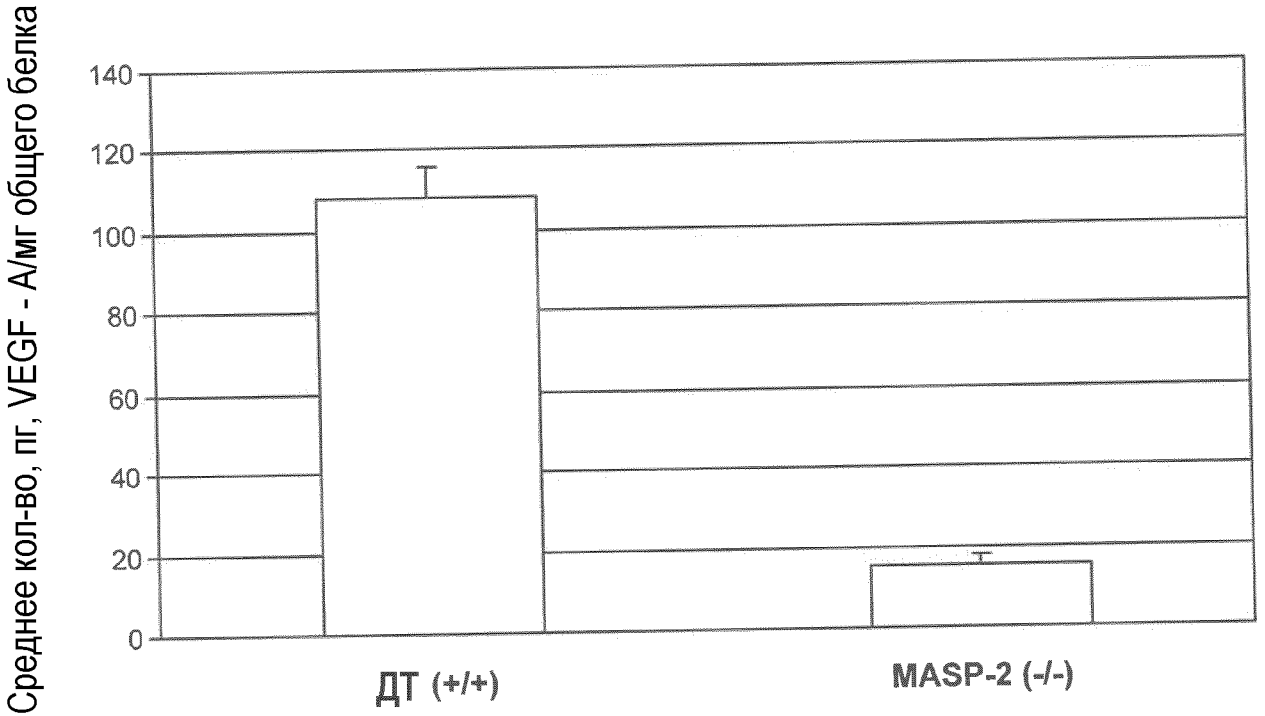
ФИГ.12


Клиренс азота мочевины крови (ммоль/л)
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
MASP-2 (-/-)
(+/+)
MASP-2 (-/-)
(+/+)
24 ч
48 ч

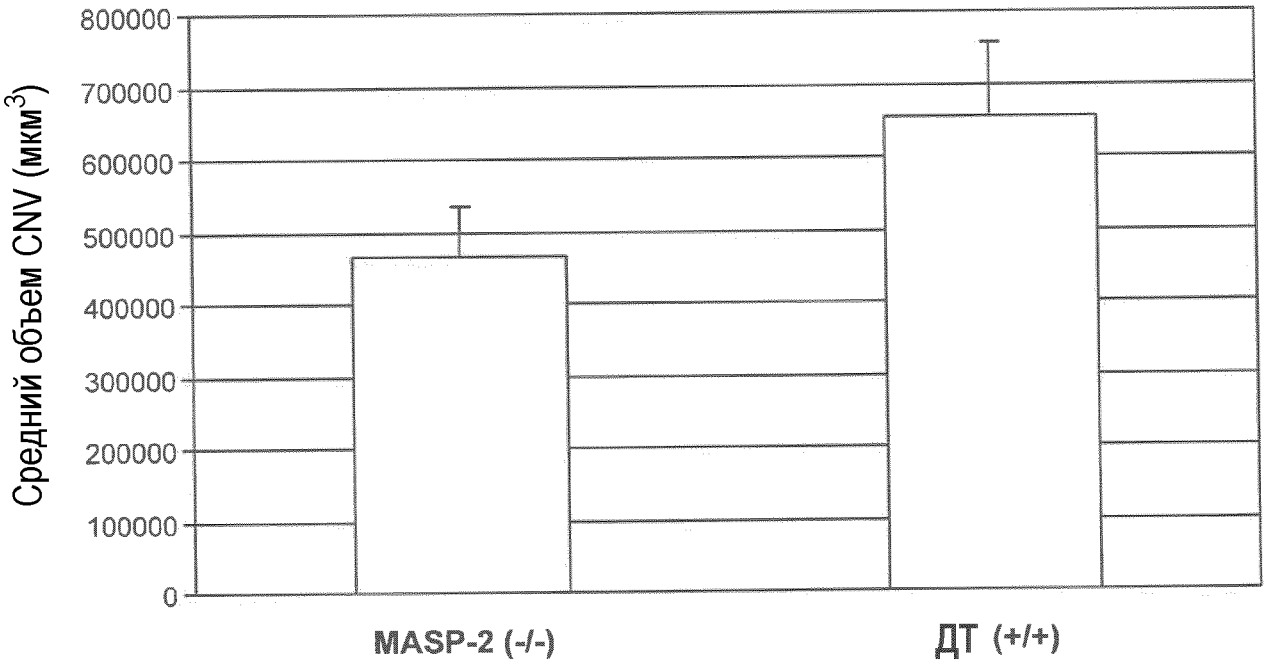
ФИГ.13А


Среднее кол-во, пг, VEGF - A/мг общего белка
60
50
40
30
20
10
0
ДТ (+/+)
MASP-2 (-/-)

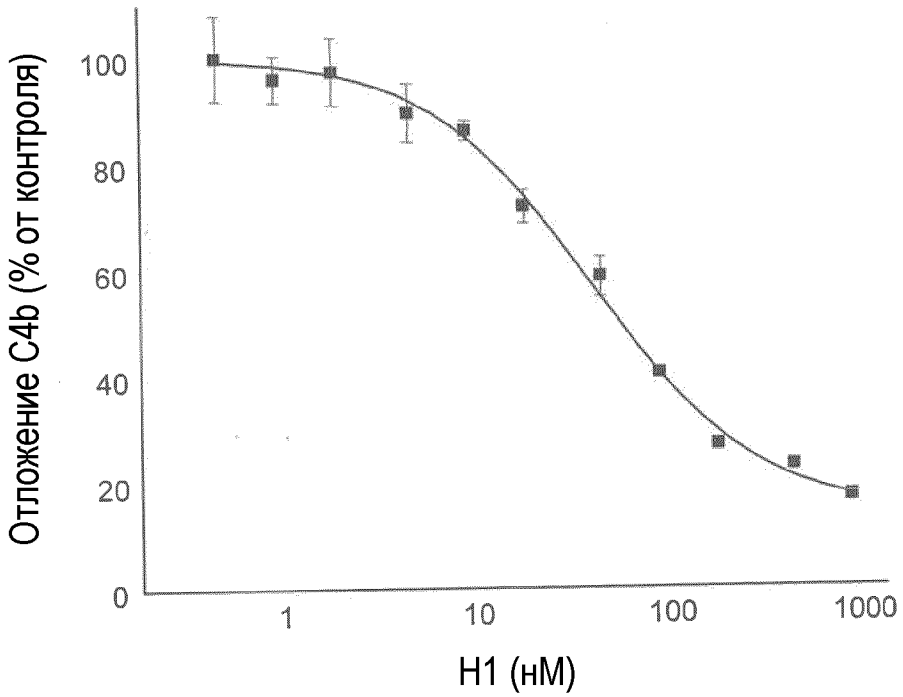
ФИГ.13В


Среднее кол-во, пг, VEGF - А/мг общего белка
140
120
100
80
60
40
20
0
ДТ (+/+)
MASP-2 (-/-)

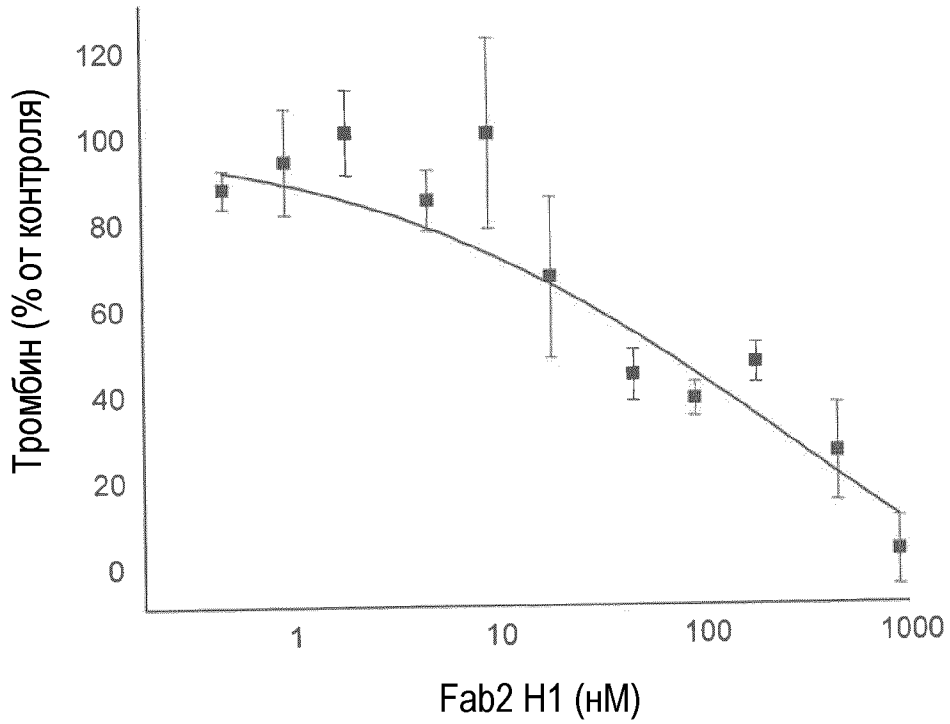
ФИГ.14


Средний объем CNV (мкм3)
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
MASP-2 (-/-)
ДТ (+/+)

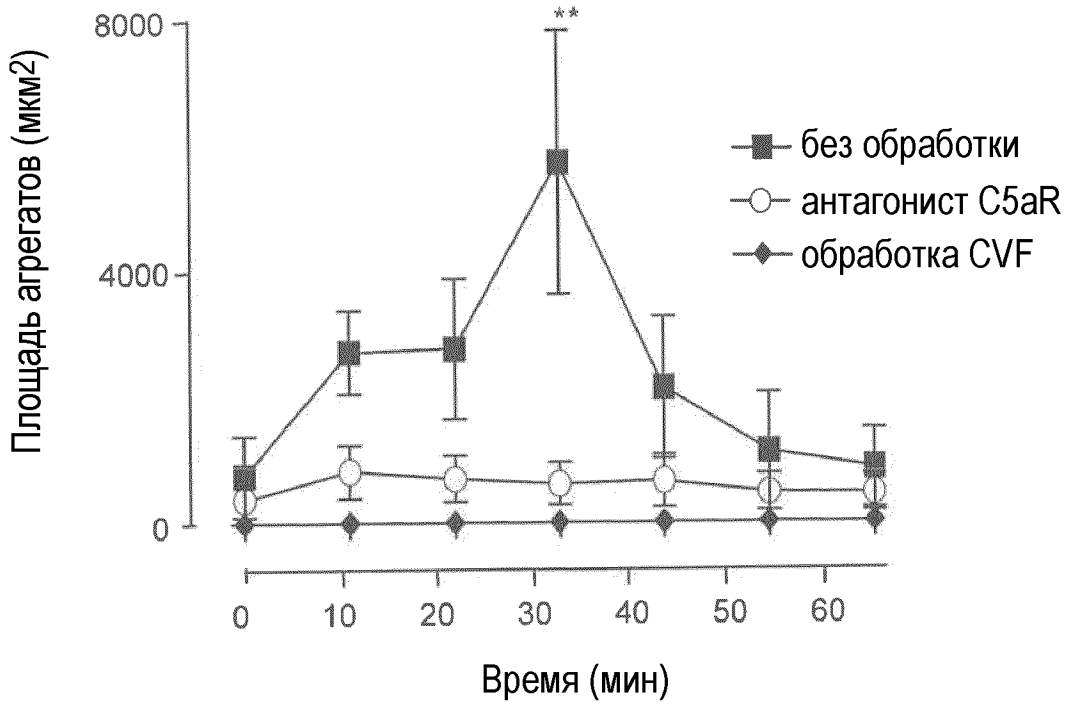
ФИГ.15А



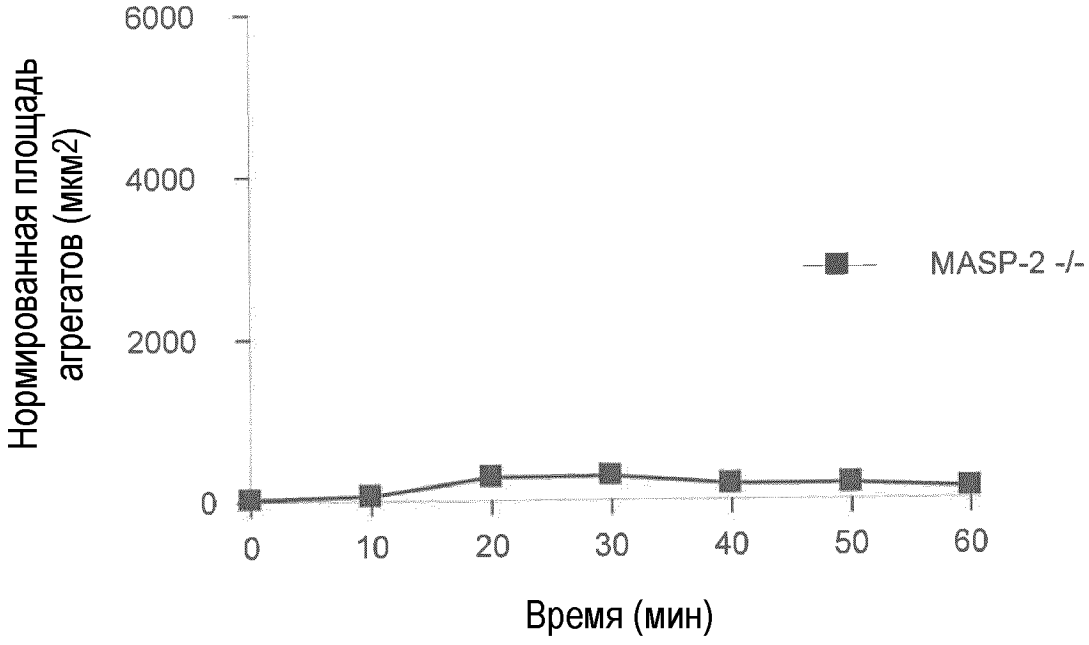
ФИГ.15В



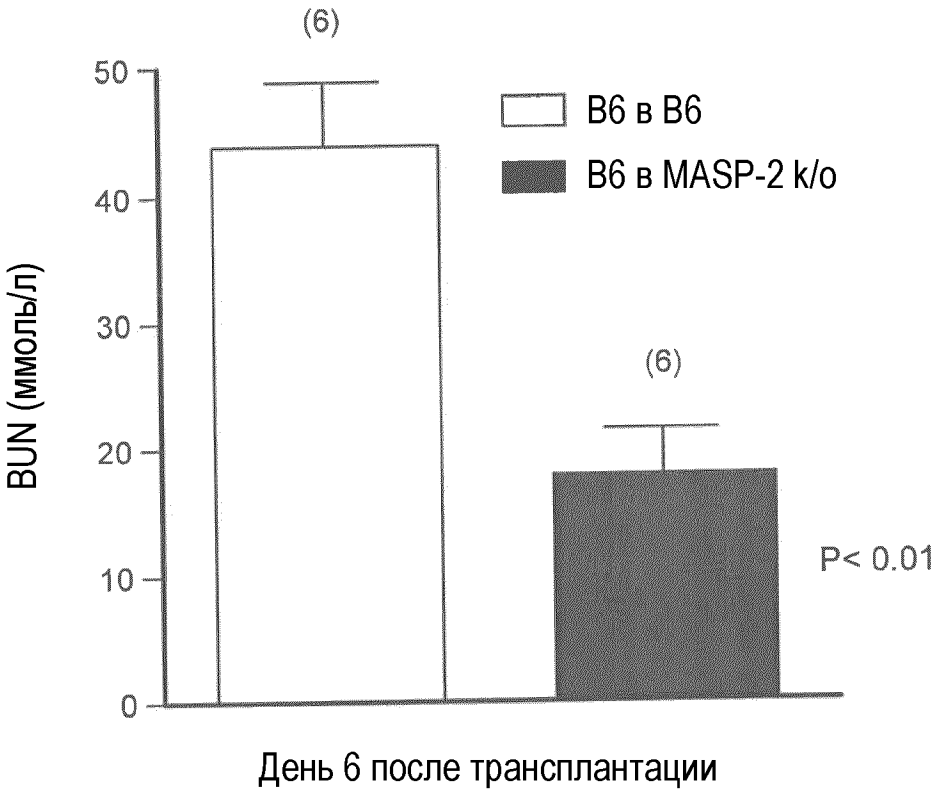
ФИГ.16А



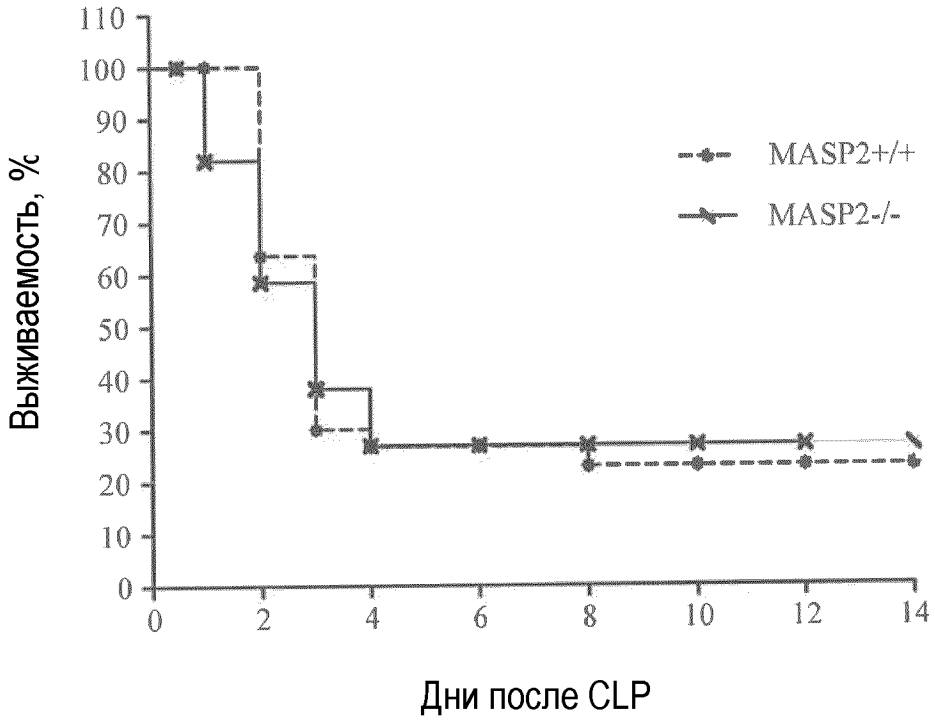
ФИГ.16В



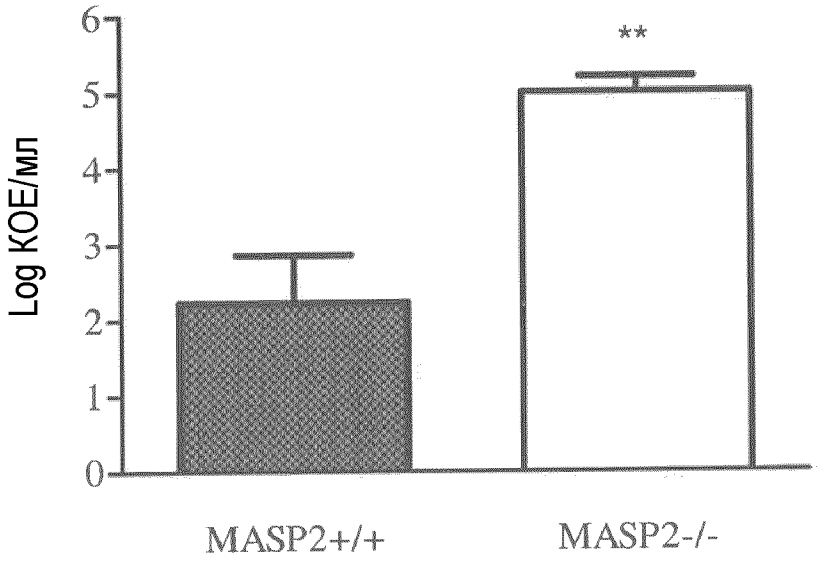
ФИГ.17


(6)
50
40
30
20
10
0
BUN (ммоль/л)
B6 в B6
B6 в MASP-2 k/o
(6)
P< 0.01
День 6 после трансплантации

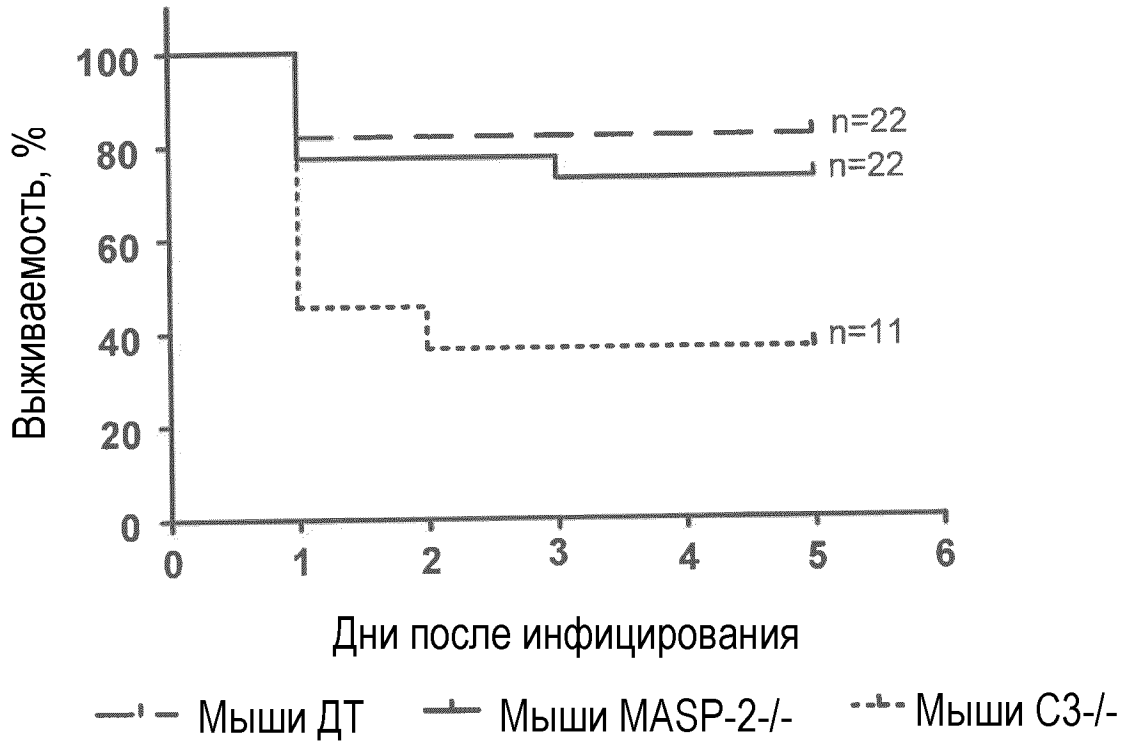
ФИГ.18


110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Выживаемость, %
0
2
4
6
8
10
12
14
Дни после CLP
MASP2+/+
MASP2-/-

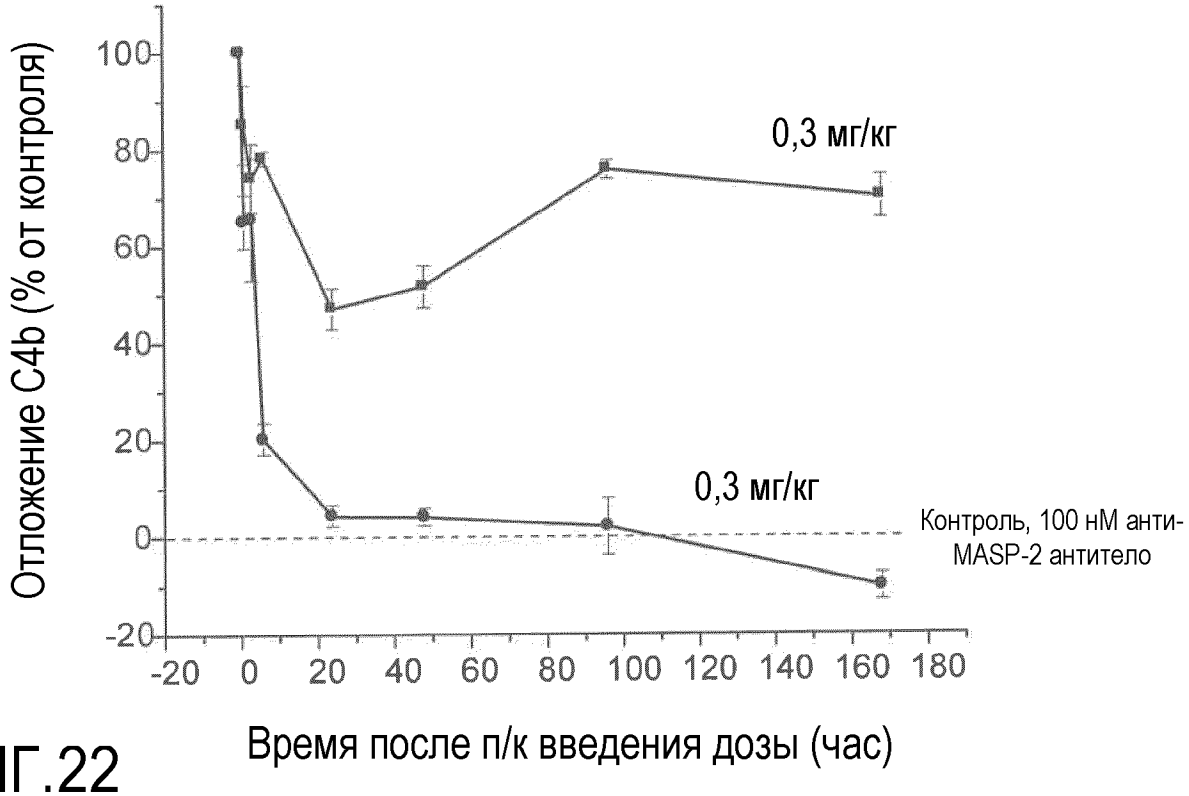
ФИГ.19


6
5
4
3
2
1
0
Log КОЕ/мл
**
MASP2+/+
MASP2-/-

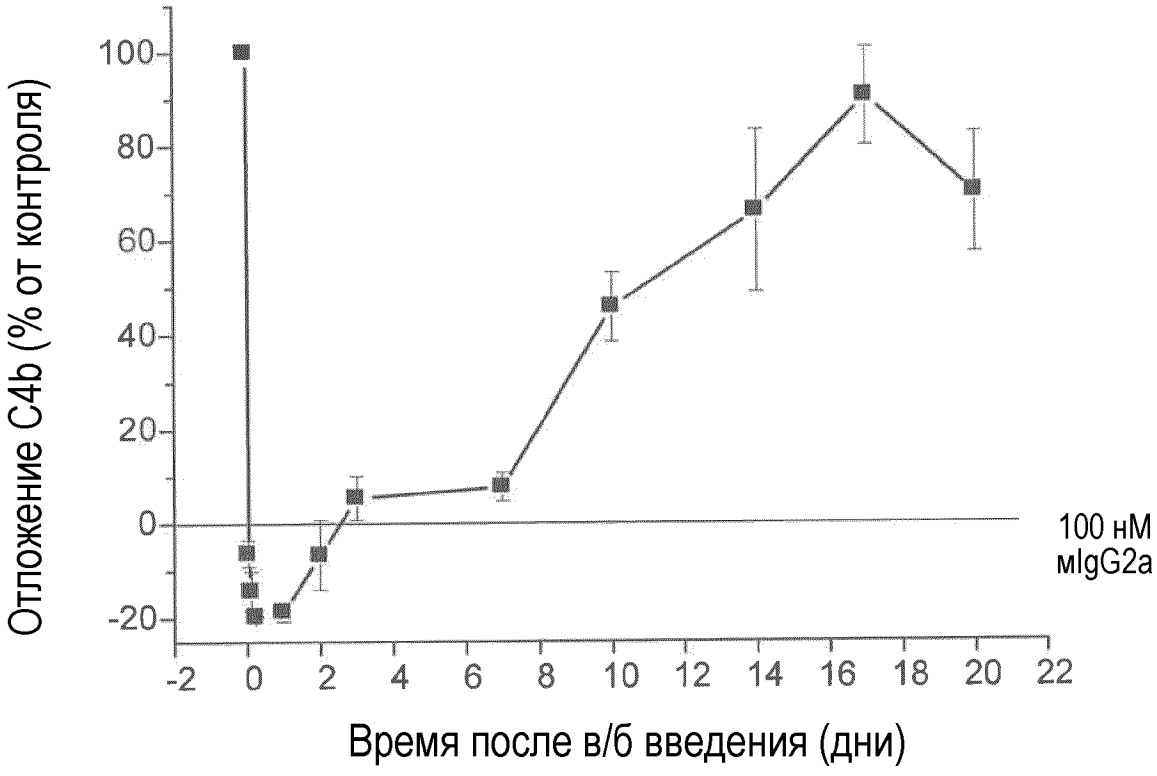
ФИГ.20


Выживаемость, %
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
n=22
n=22
n=11
Дни после инфицирования
Мыши ДТ
Мыши MASP-2-/-
Мыши C3-/-

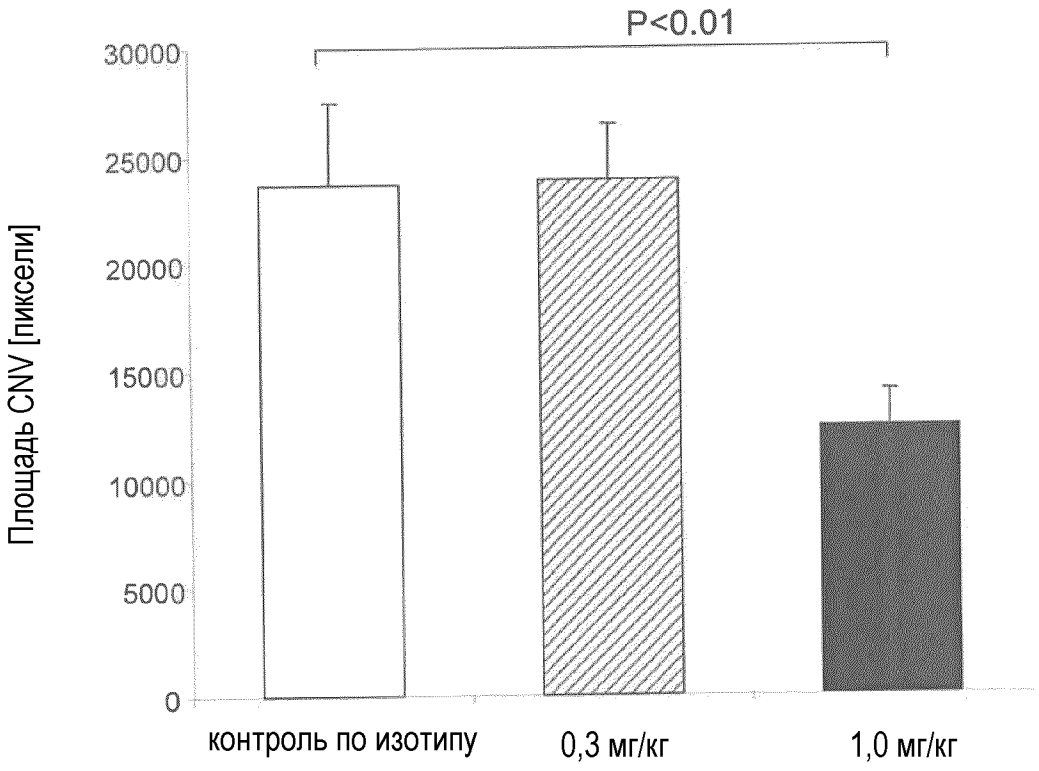
ФИГ.21


Отложение C4b (% от контроля)
100
80
60
40
20
0
-20
-20 0 20 40 60 80 100 120 140 160 180
0,3 мг/кг
0,3 мг/кг
Контроль, 100 нМ анти-MASP-2 антитело
Время после п/к введения дозы (час)

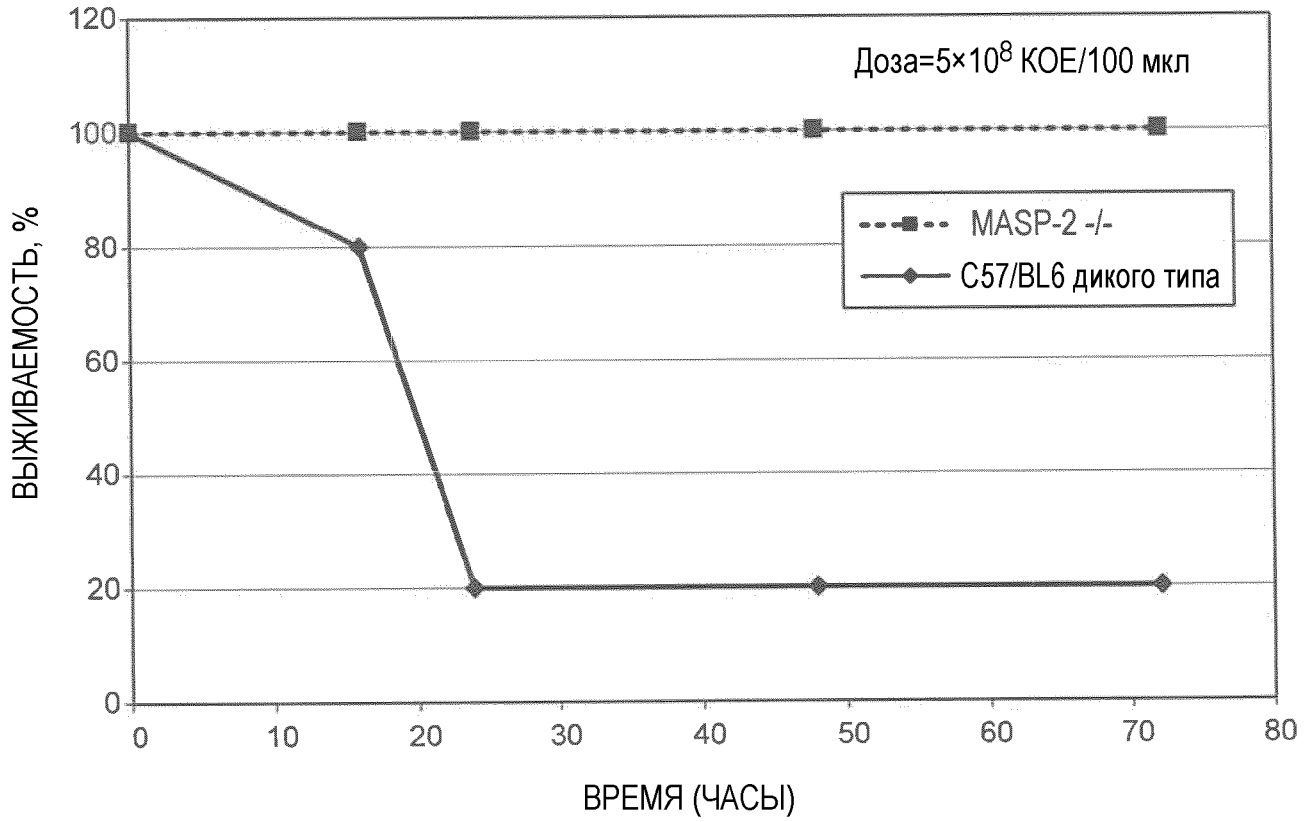
ФИГ.22


Отложение C4b (% от контроля)
100
80
60
40
20
0
-20
-2 0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22
100 нМ mIgG2a
Время после в/б введения (дни)

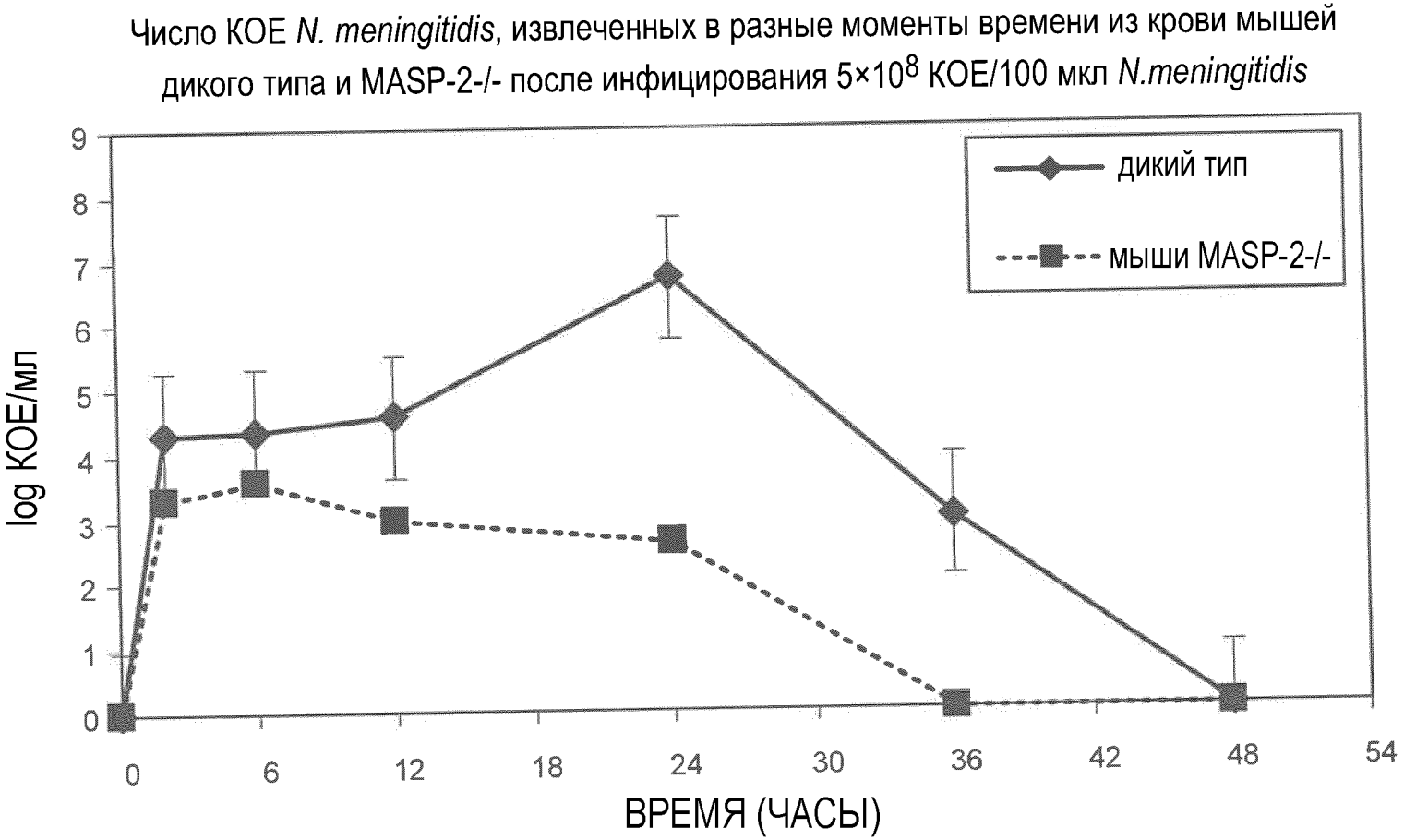
ФИГ.23


P<0.01
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Площадь CNV [пиксели]
контроль по изотипу
0,3 мг/кг
1,0 мг/кг

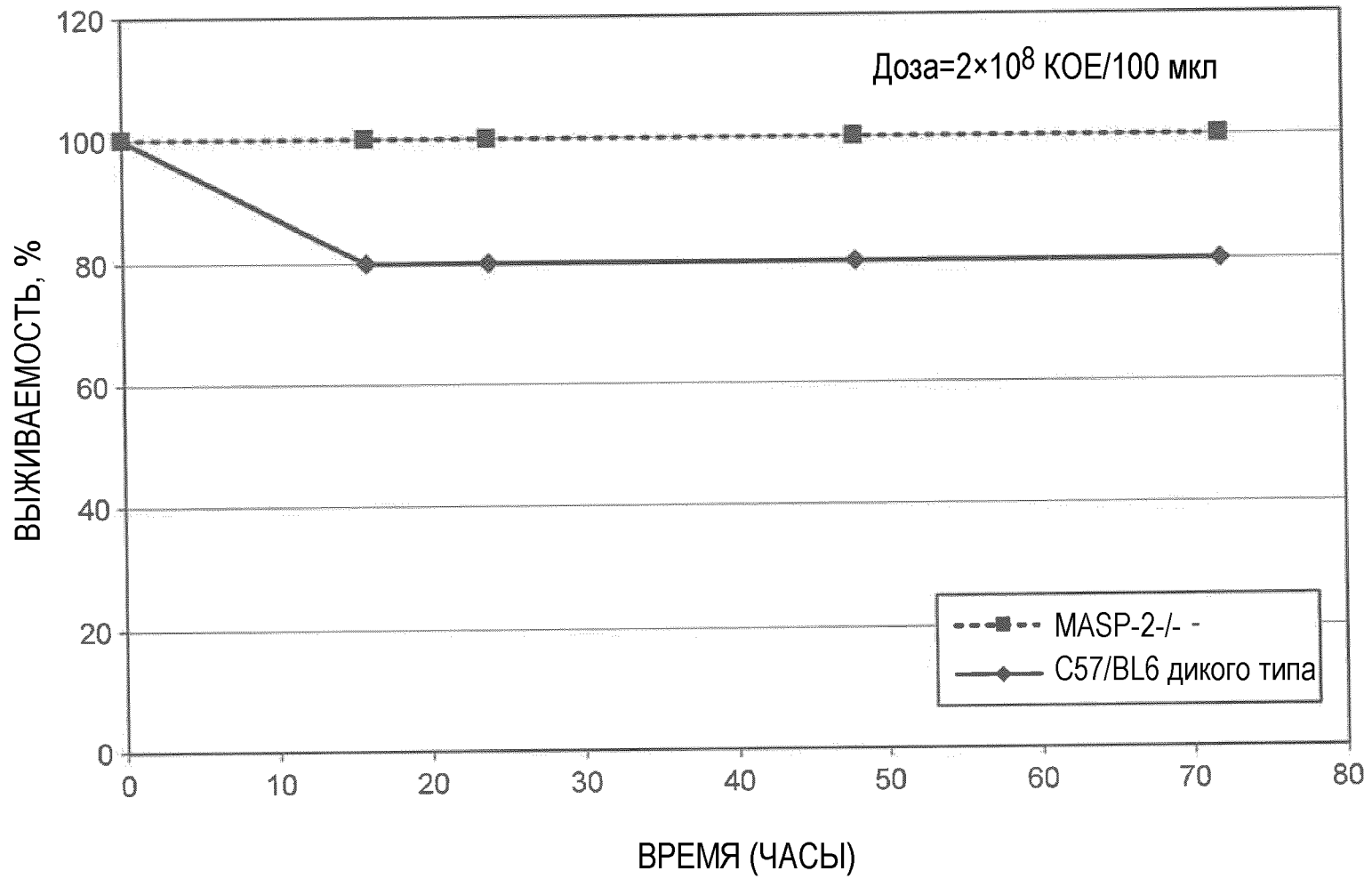
ФИГ.24А


Доза=5×10^8 КОЕ/100 мкл
MASP-2 -/-
C57/BL6 дикого типа
ВЫЖИВАЕМОСТЬ, %
ВРЕМЯ (ЧАСЫ)
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80

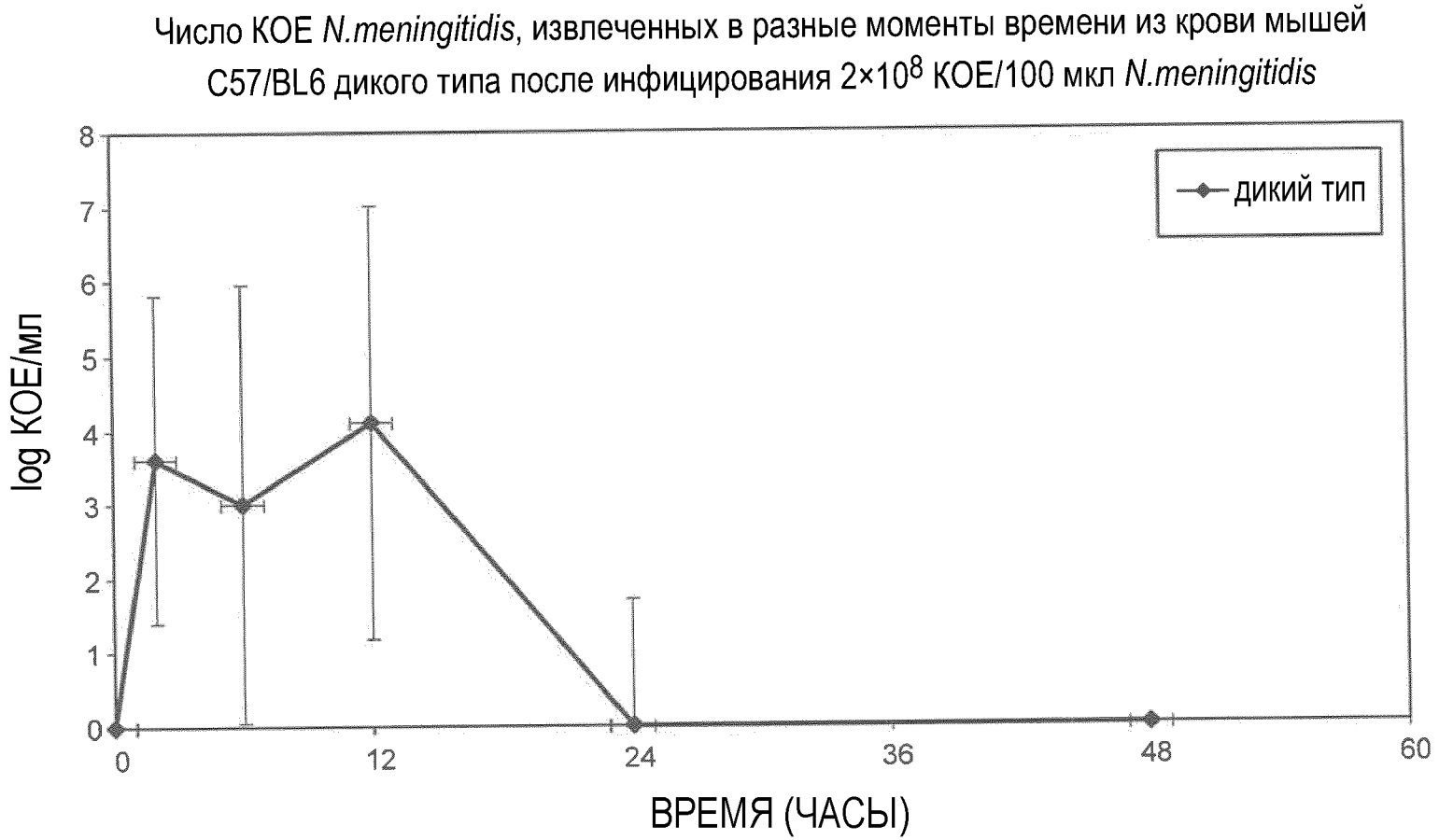
ФИГ.24В


Число КОЕ *N. meningitidis*, извлеченных в разные моменты времени из крови мышей дикого типа и MASP-2-/- после инфицирования 5×10^8 КОЕ/100 мкл *N.meningitidis*
дикий тип
мыши MASP-2-/-
log КОЕ/мл
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
0
6
12
18
24
30
36
42
48
54
ВРЕМЯ (ЧАСЫ)

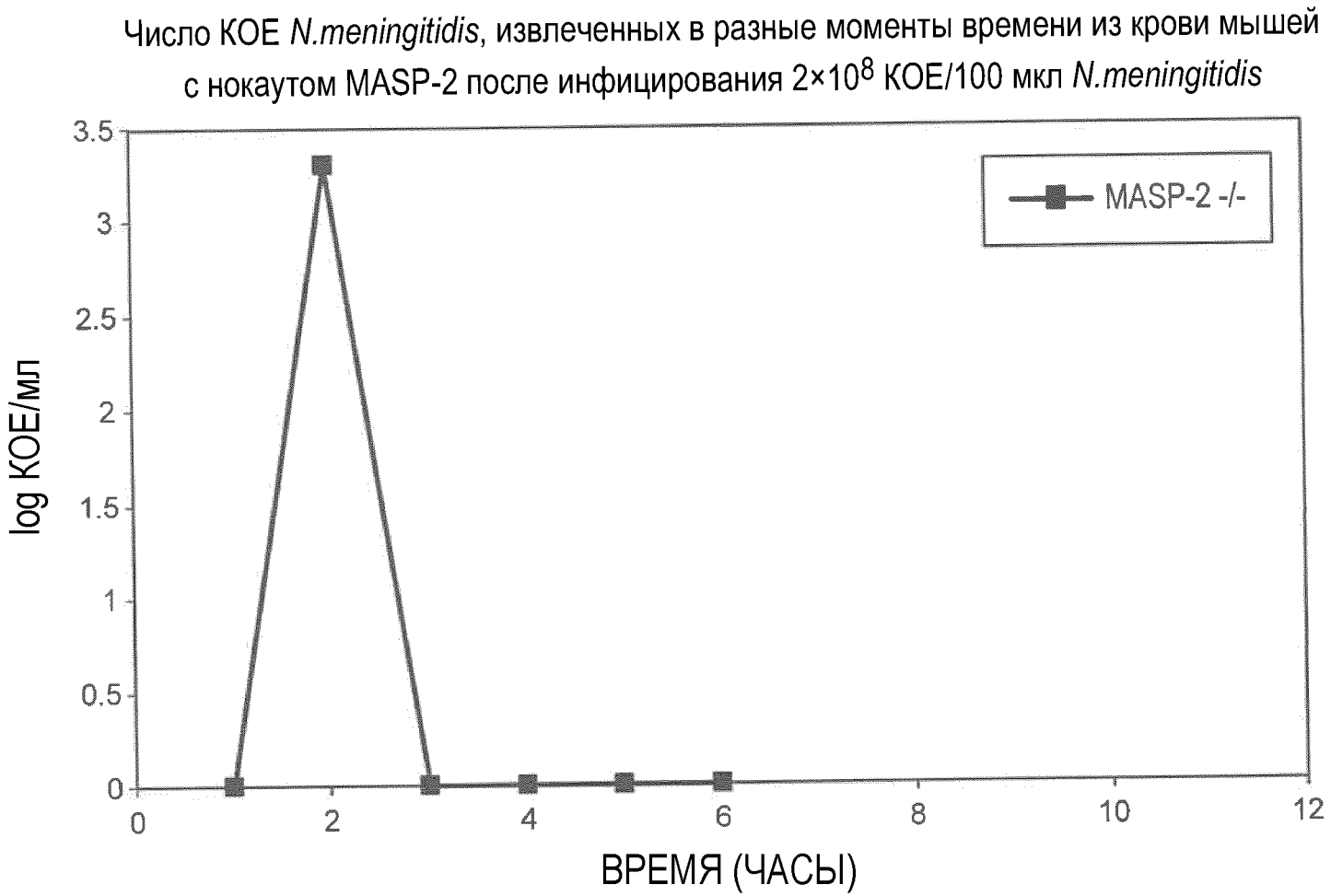
ФИГ.25А


Доза=2×10^8 КОЕ/100 мкл
ВЫЖИВАЕМОСТЬ, %
ВРЕМЯ (ЧАСЫ)
MASP-2-/- -
C57/BL6 дикого типа
0
20
40
60
80
100
120
0
10
20
30
40
50
60
70
80

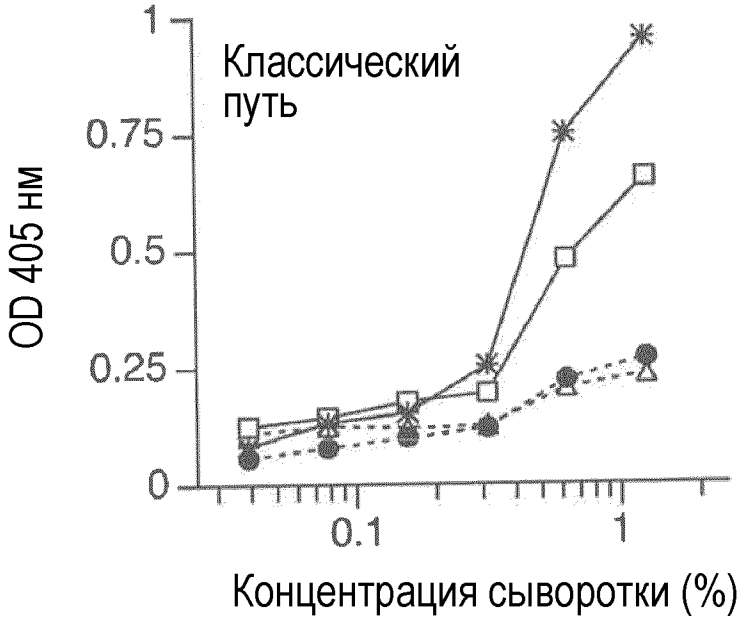
ФИГ.25B


Число КОЕ *N.meningitidis*, извлеченных в разные моменты времени из крови мышей C57/BL6 дикого типа после инфицирования 2×10^8 КОЕ/100 мкл *N.meningitidis*
дикий тип
log КОЕ/мл
0
1
2
3
4
5
6
7
8
0
12
24
36
48
60
ВРЕМЯ (ЧАСЫ)

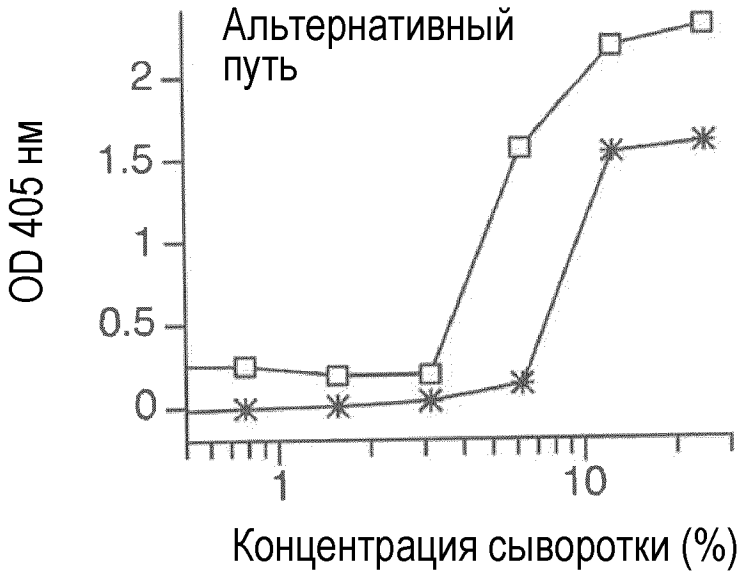
ФИГ.25С


Число КОЕ *N.meningitidis*, извлеченных в разные моменты времени из крови мышей с нокаутом MASP-2 после инфицирования 2×10^8 КОЕ/100 мкл *N.meningitidis*
MASP-2 -/-
log КОЕ/мл
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
2
4
6
8
10
12
ВРЕМЯ (ЧАСЫ)

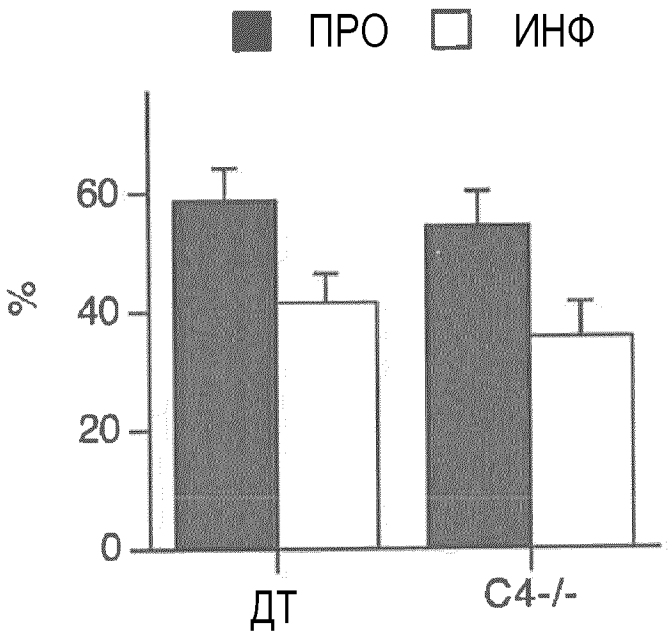
ФИГ.26A



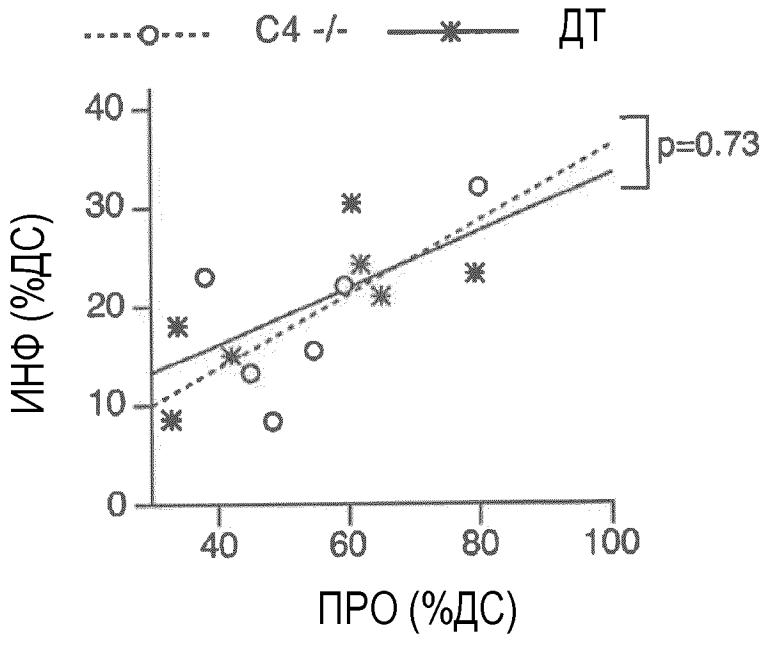
ФИГ.26B



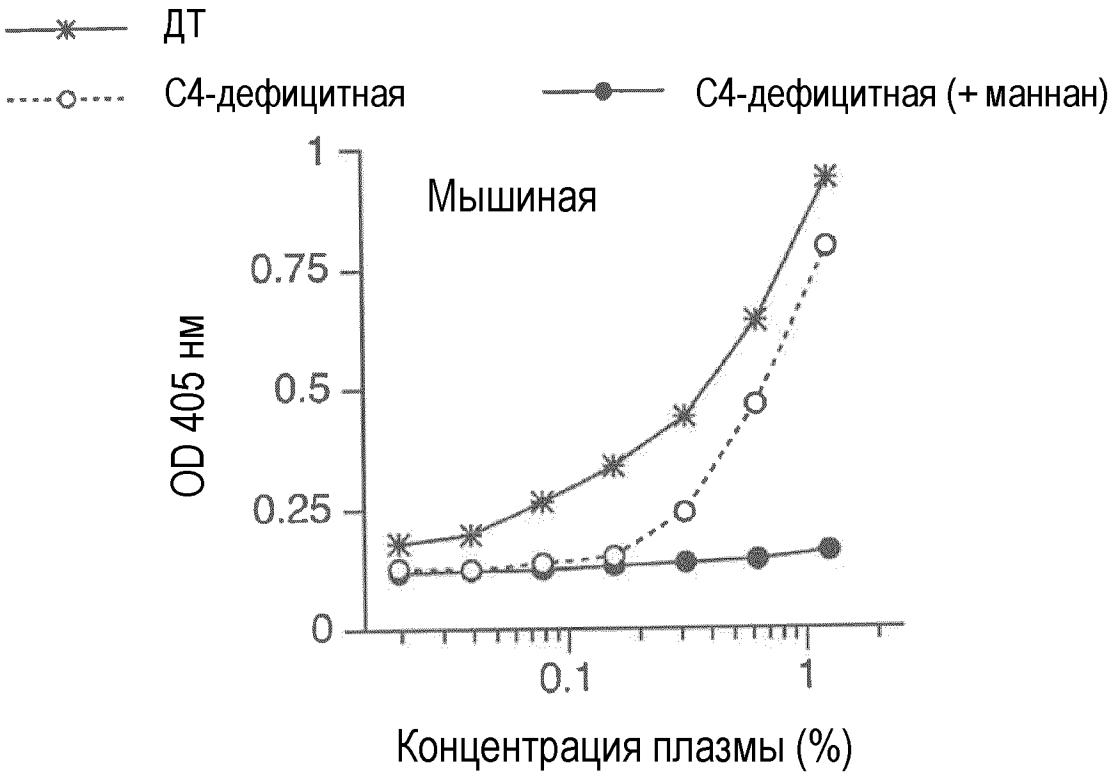
ФИГ.27А



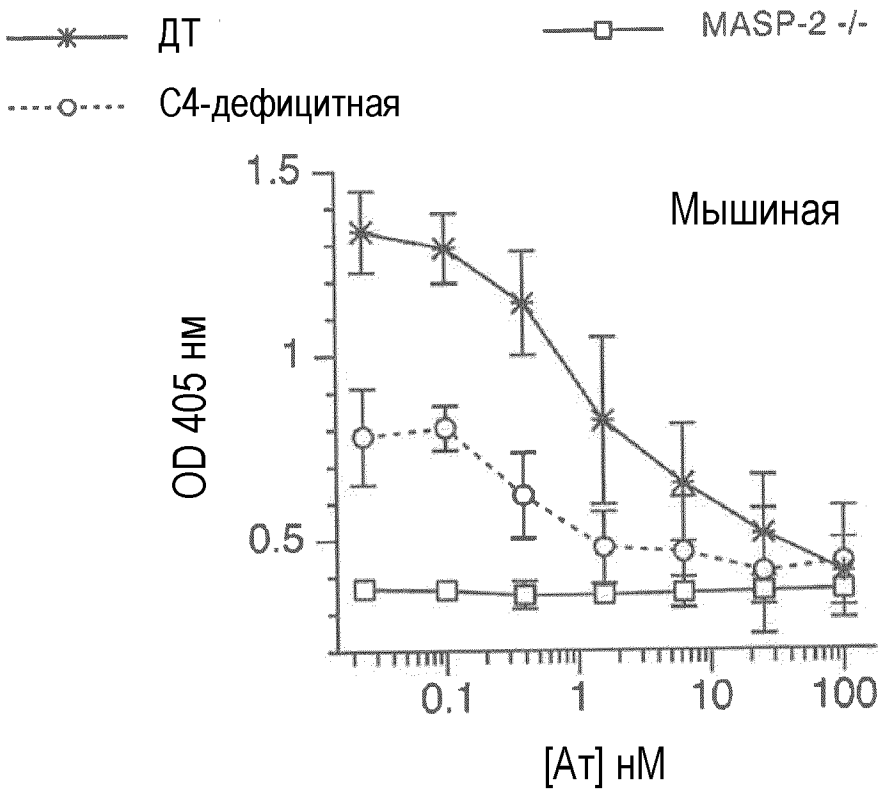
ФИГ.27В



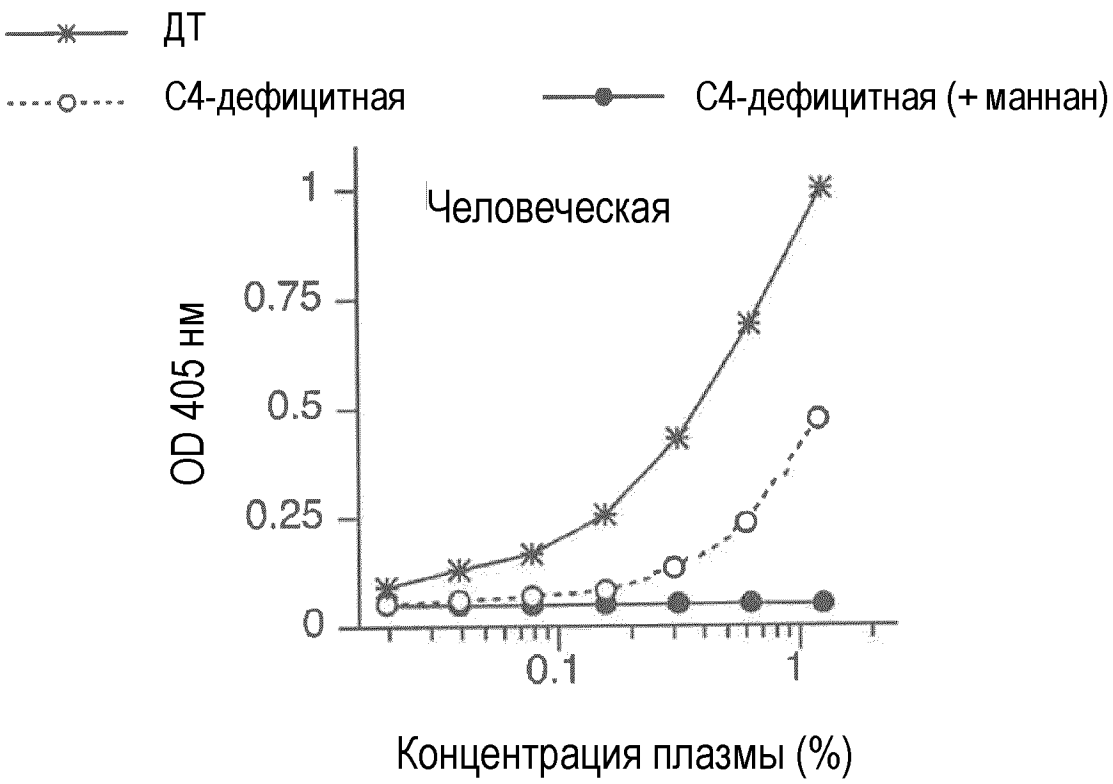
ФИГ.28А



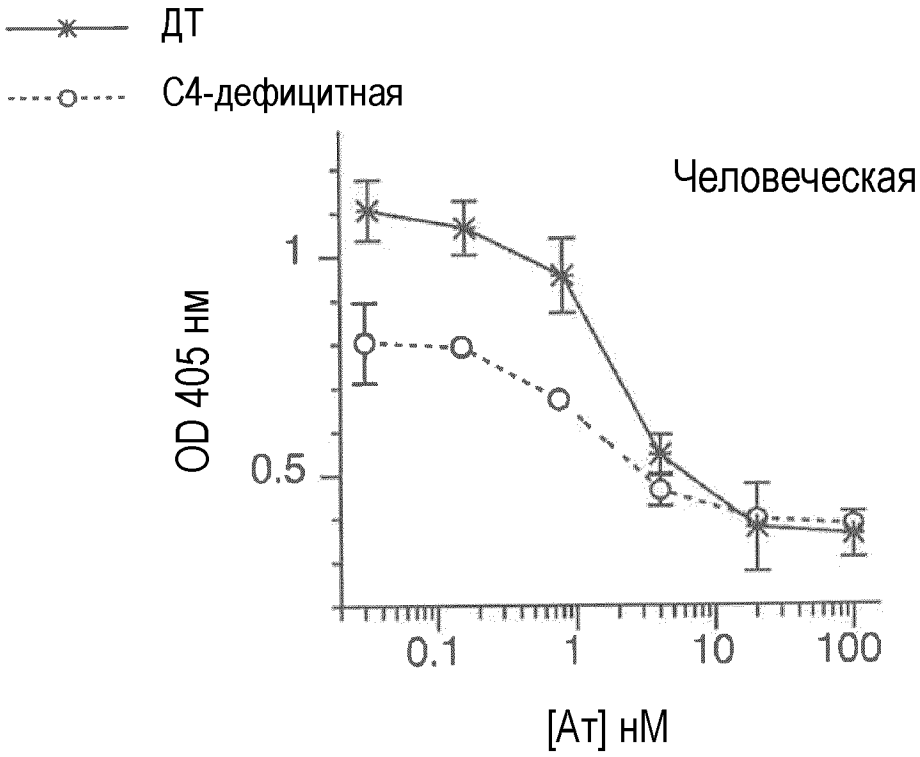
ФИГ.28В



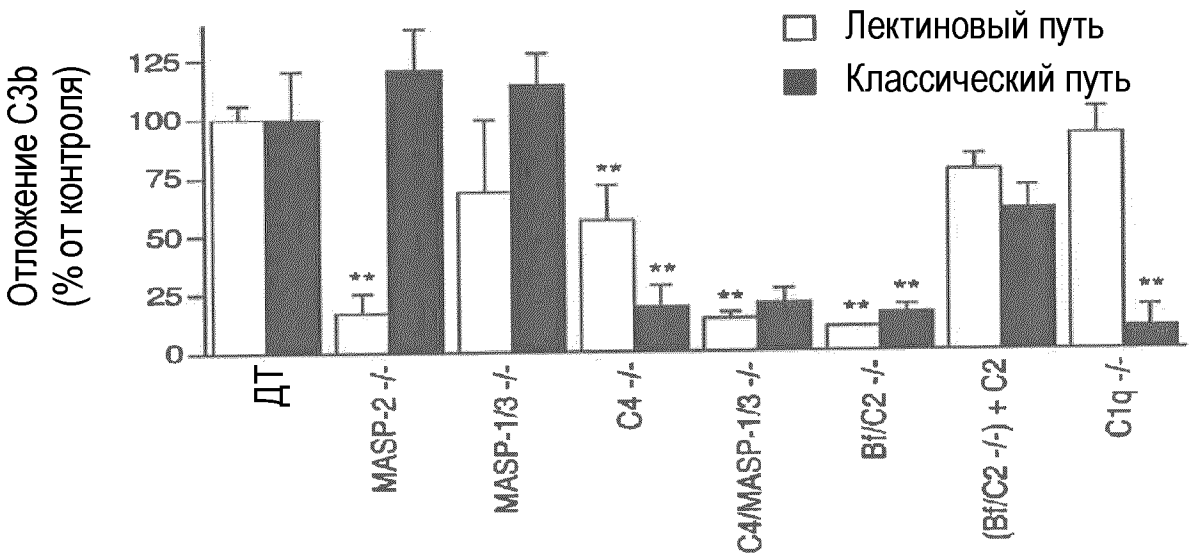
ФИГ.28C



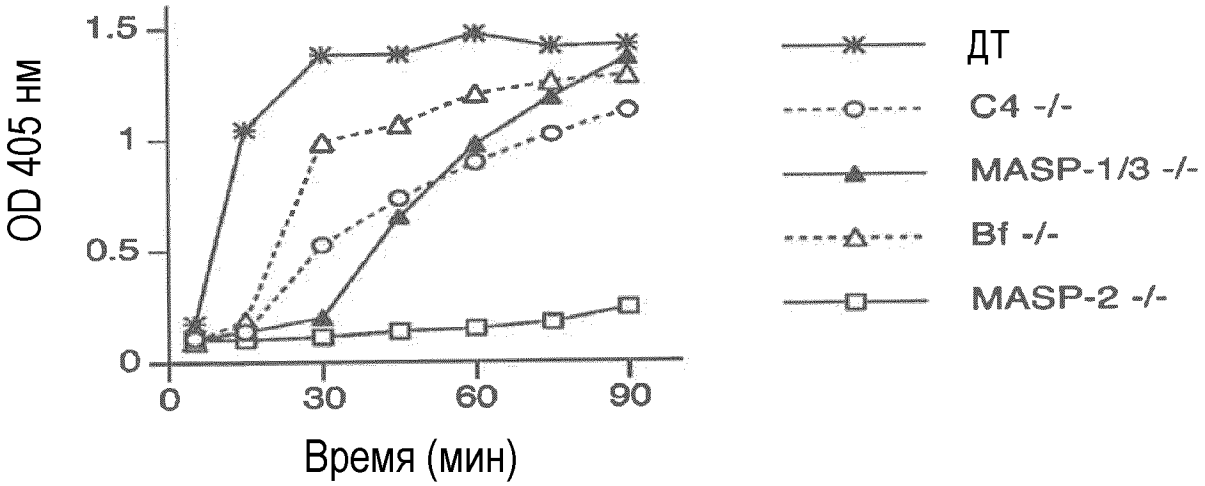
ФИГ.28D



ФИГ.29A

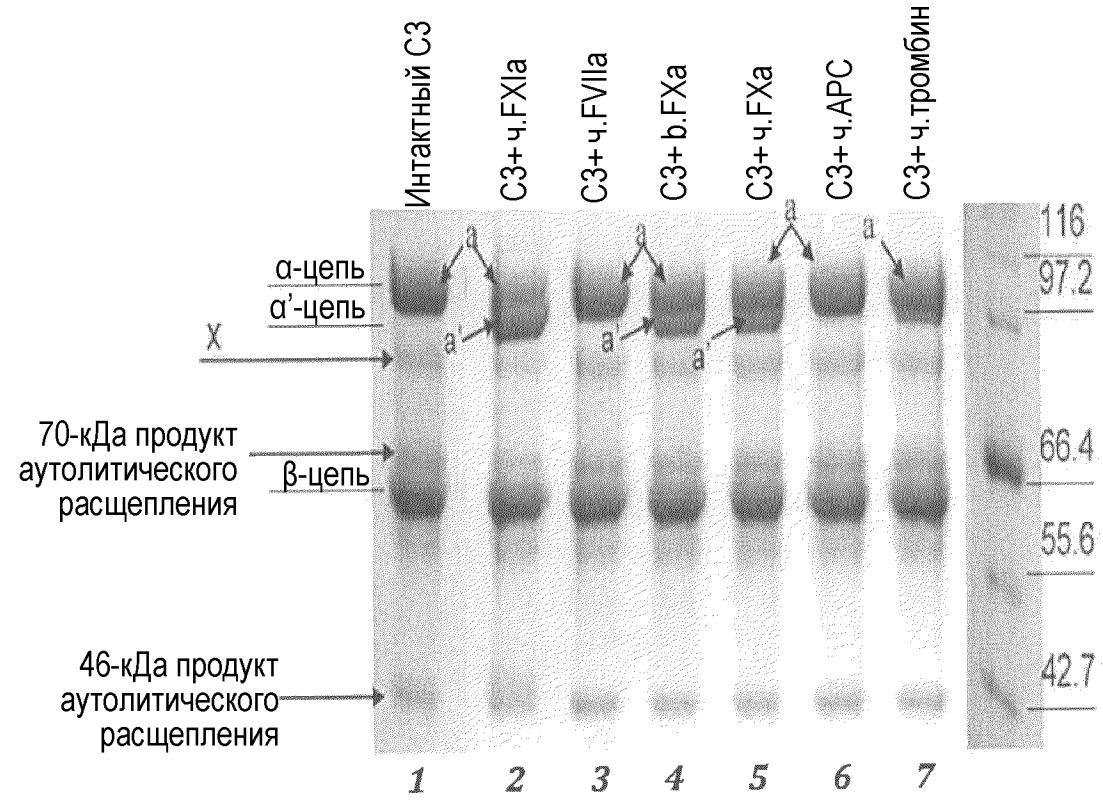


ФИГ.29B

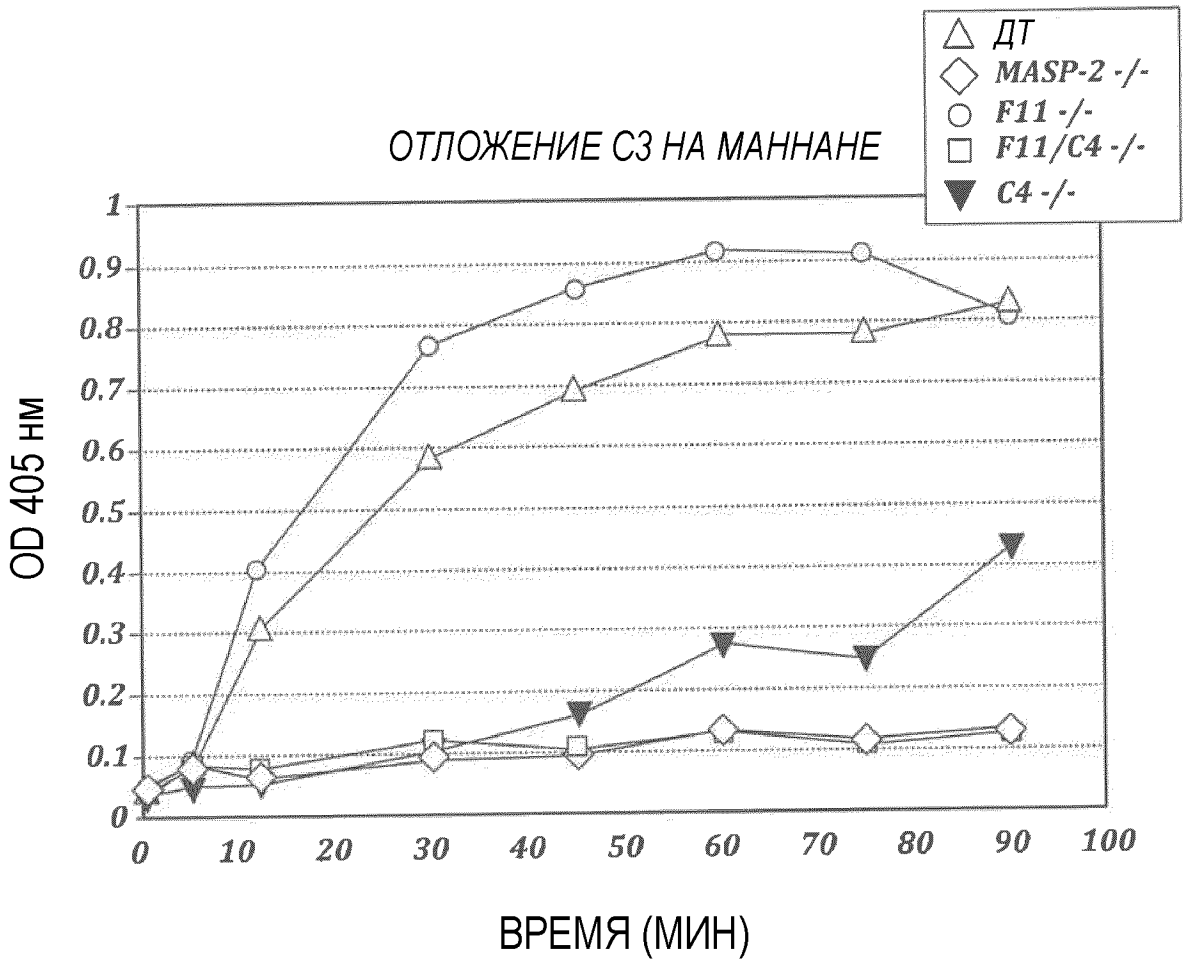


ФИГ.30

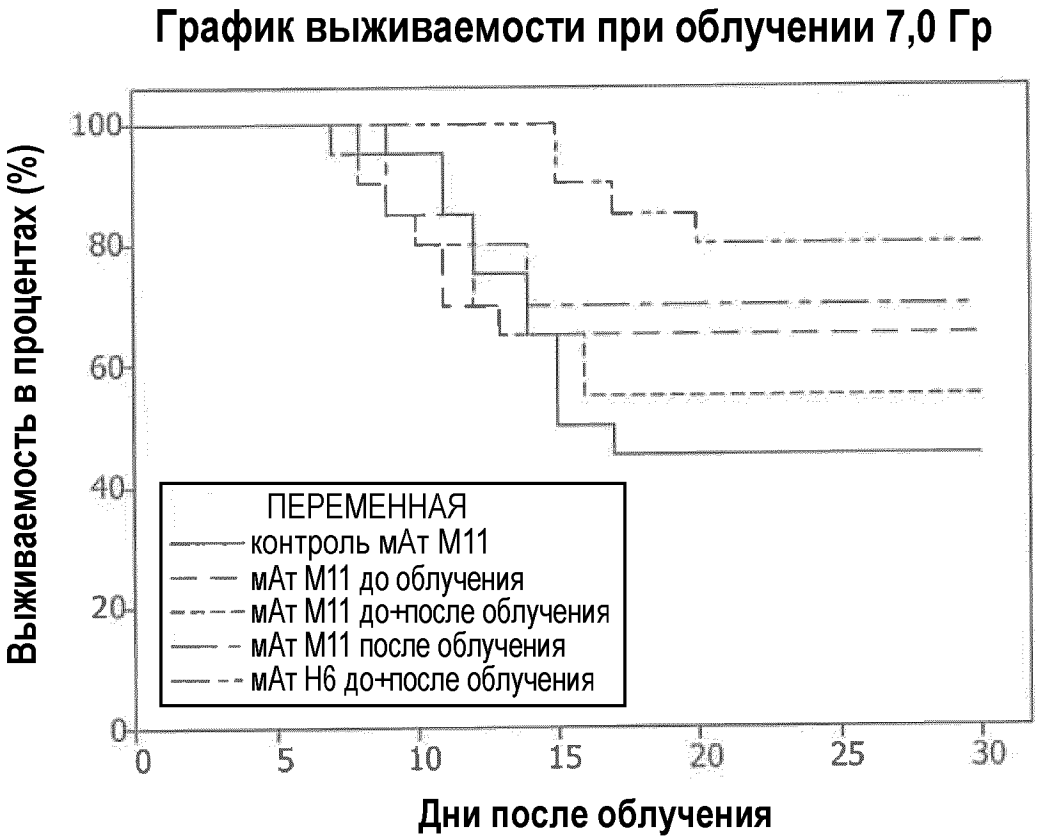
Активация C3 тромбиновыми субстратами



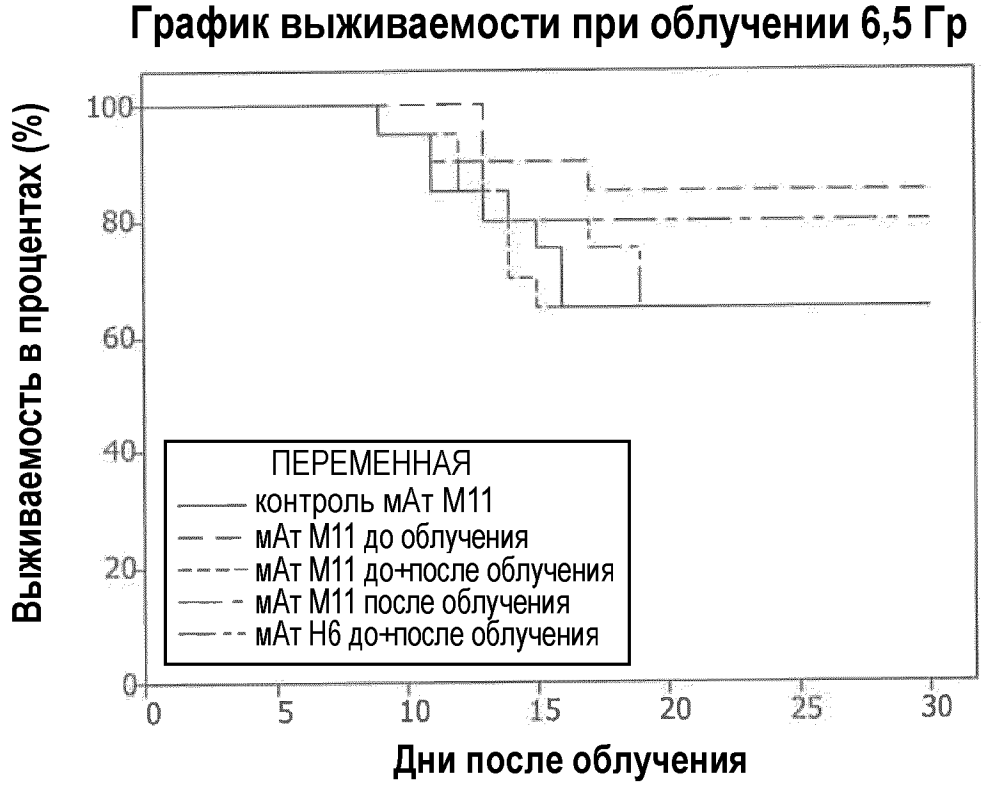
ФИГ.31


ОТЛОЖЕНИЕ C3 НА МАННАНЕ
ДТ
MASP-2 -/-
F11 -/-
F11/C4 -/-
C4 -/-
OD 405 нм
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
ВРЕМЯ (МИН)

ФИГ.32A

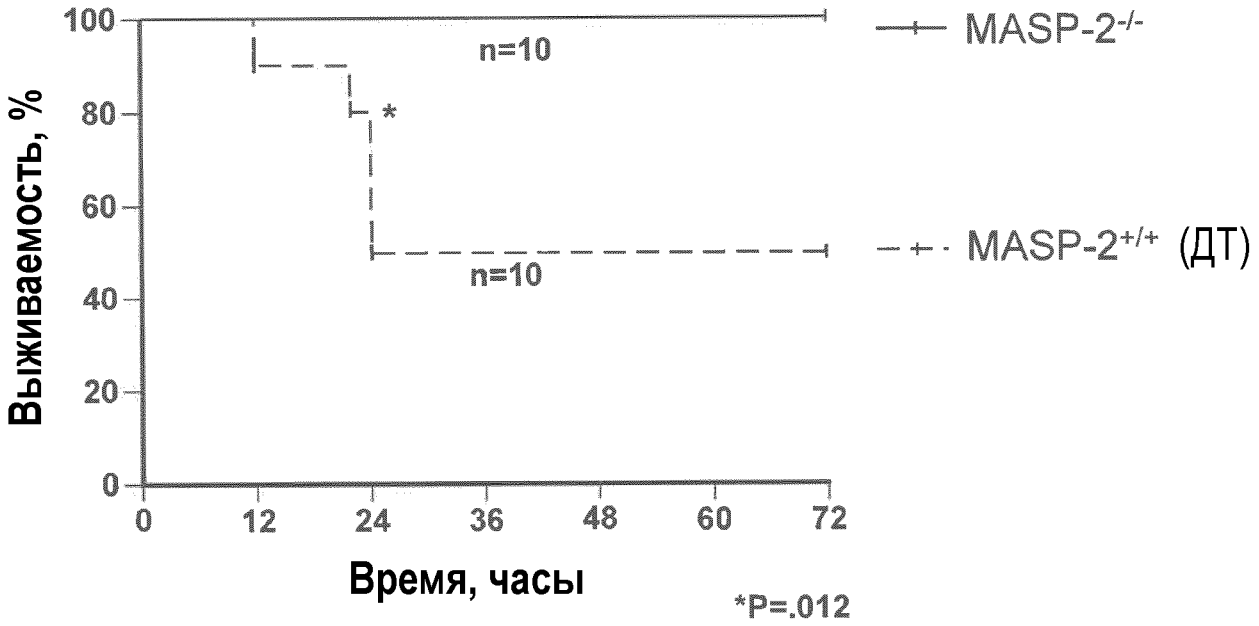


ФИГ.32B

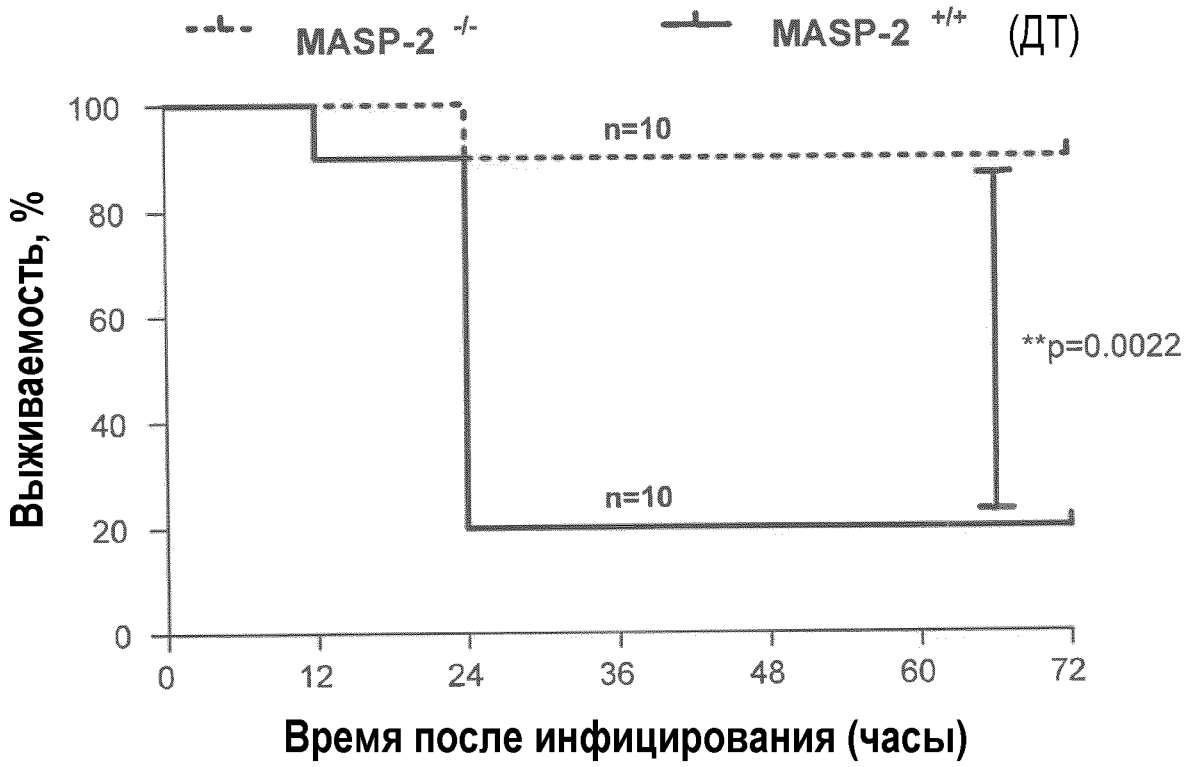


ФИГ.33

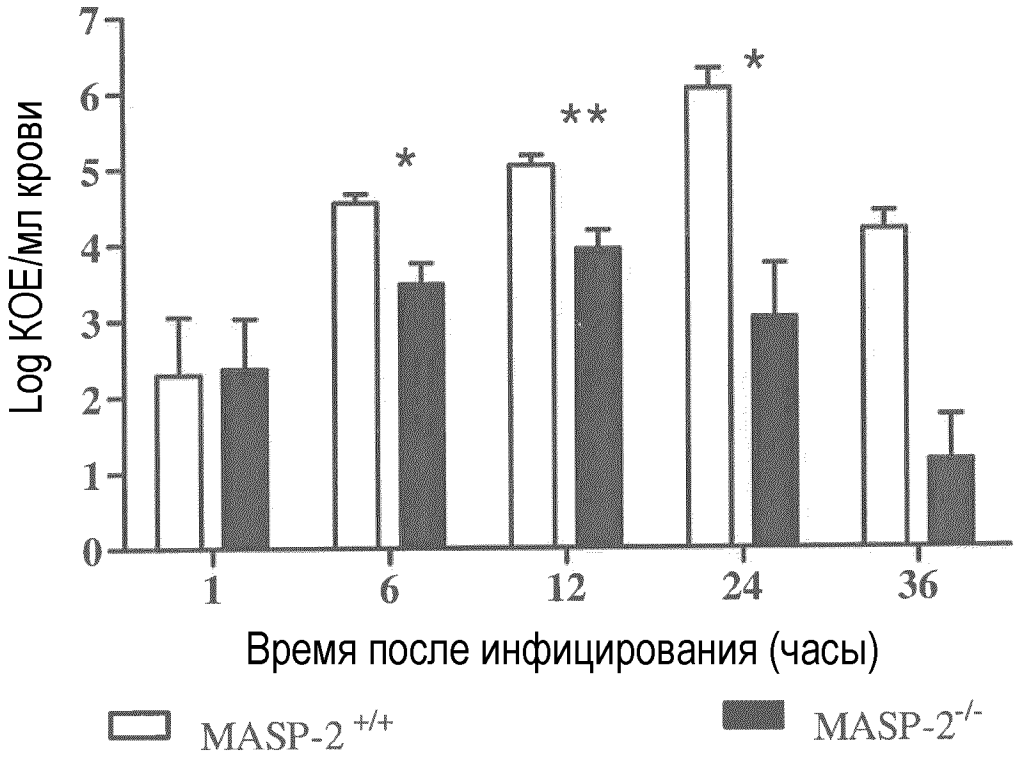
Выживаемость после инфицирования *N.meningitidis* серогруппы A Z2491



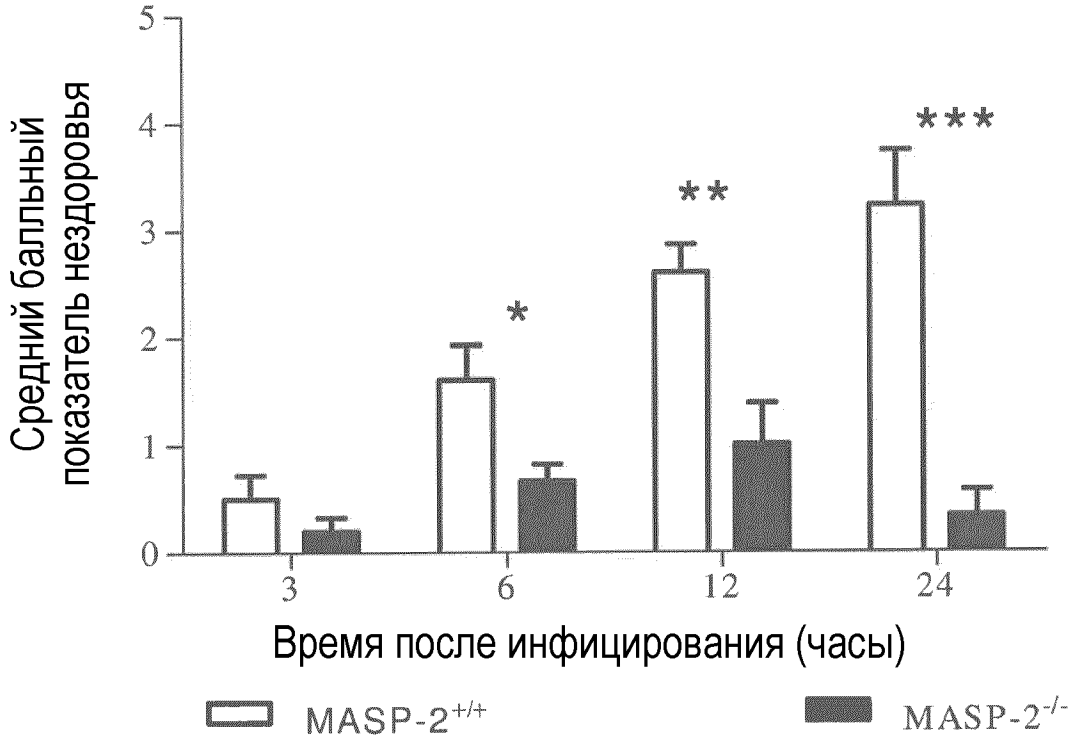
ФИГ.34


MASP-2 -/-
MASP-2 +/+
(ДТ)
100
80
60
40
20
0
Выживаемость, %
n=10
n=10
**p=0.0022
0
12
24
36
48
60
72
Время после инфицирования (часы)

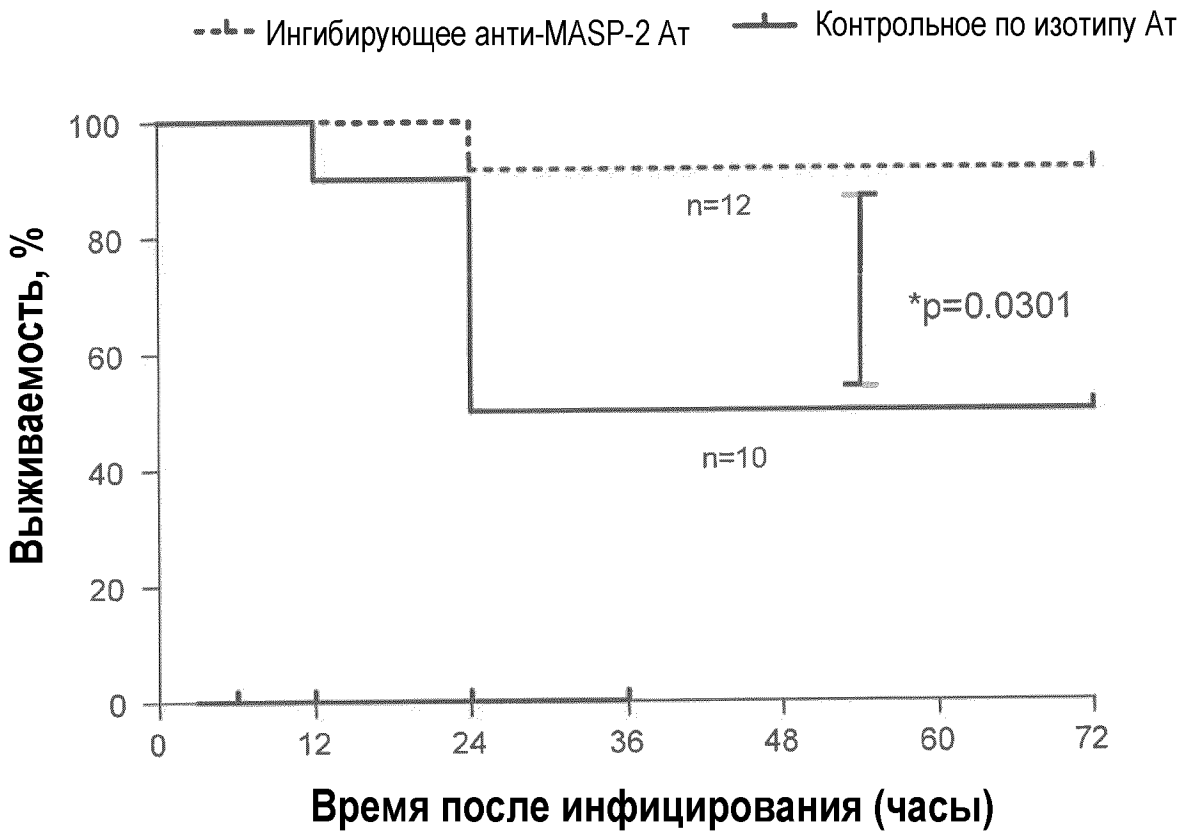
ФИГ.35


Log КОЕ/мл крови
0
1
2
3
4
5
6
7
*
**
*
1
6
12
24
36
Время после инфицирования (часы)
MASP-2 +/+
MASP-2 -/-

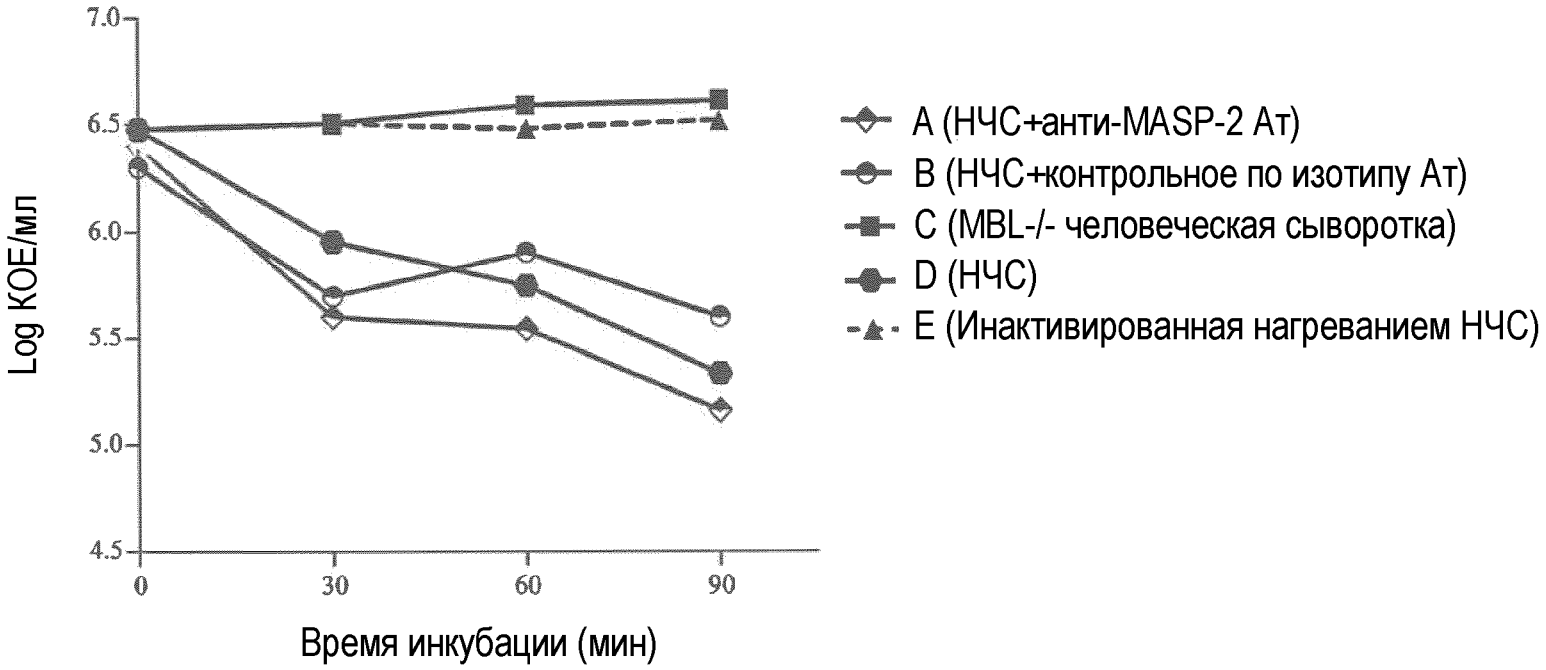
ФИГ.36


Средний балльный показатель нездоровья
5
4
3
2
1
0
*
**
***
3
6
12
24
Время после инфицирования (часы)
MASP-2+/+
MASP-2-/-

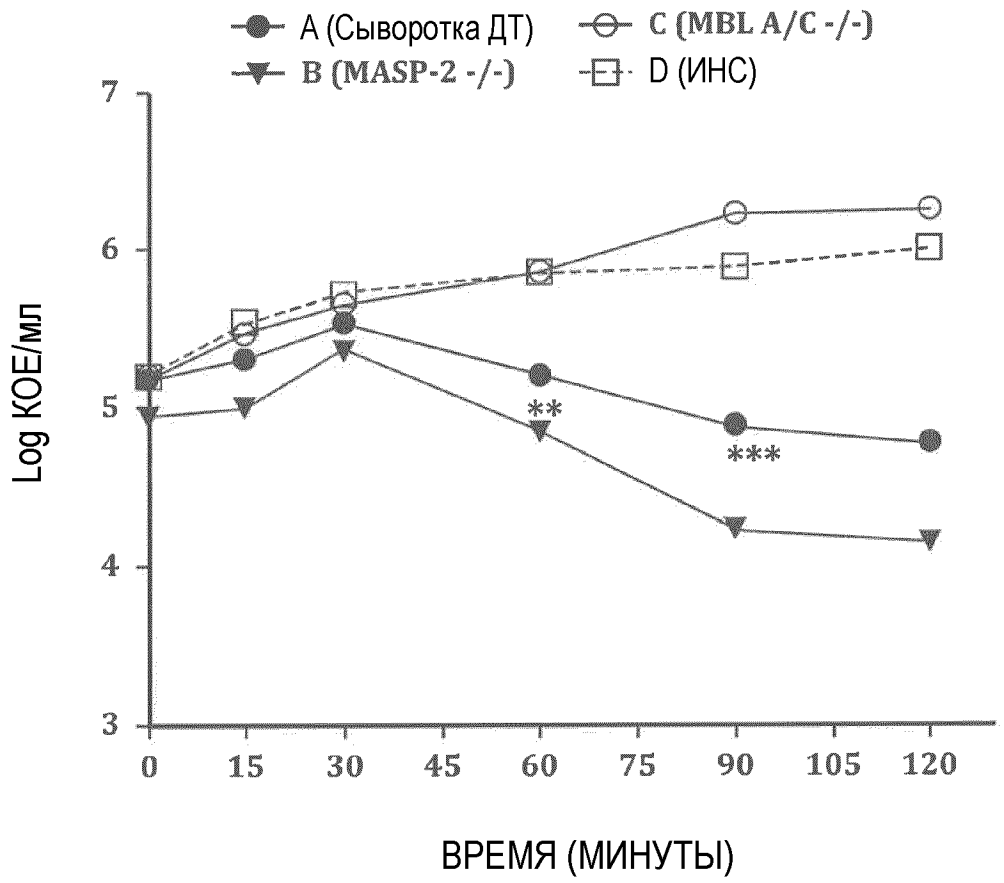
ФИГ.37


Ингибирующее анти-MASP-2 Ат
Контрольное по изотипу Ат
Выживаемость, %
100
80
60
40
20
0
n=12
*p=0.0301
n=10
0
12
24
36
48
60
72
Время после инфицирования (часы)

ФИГ.38


7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
Log КОЕ/мл
0
30
60
90
Время инкубации (мин)
A (НЧС+анти-MASP-2 Ат)
B (НЧС+контрольное по изотипу Ат)
C (MBL-/- человеческая сыворотка)
D (НЧС)
E (Инактивированная нагреванием НЧС)

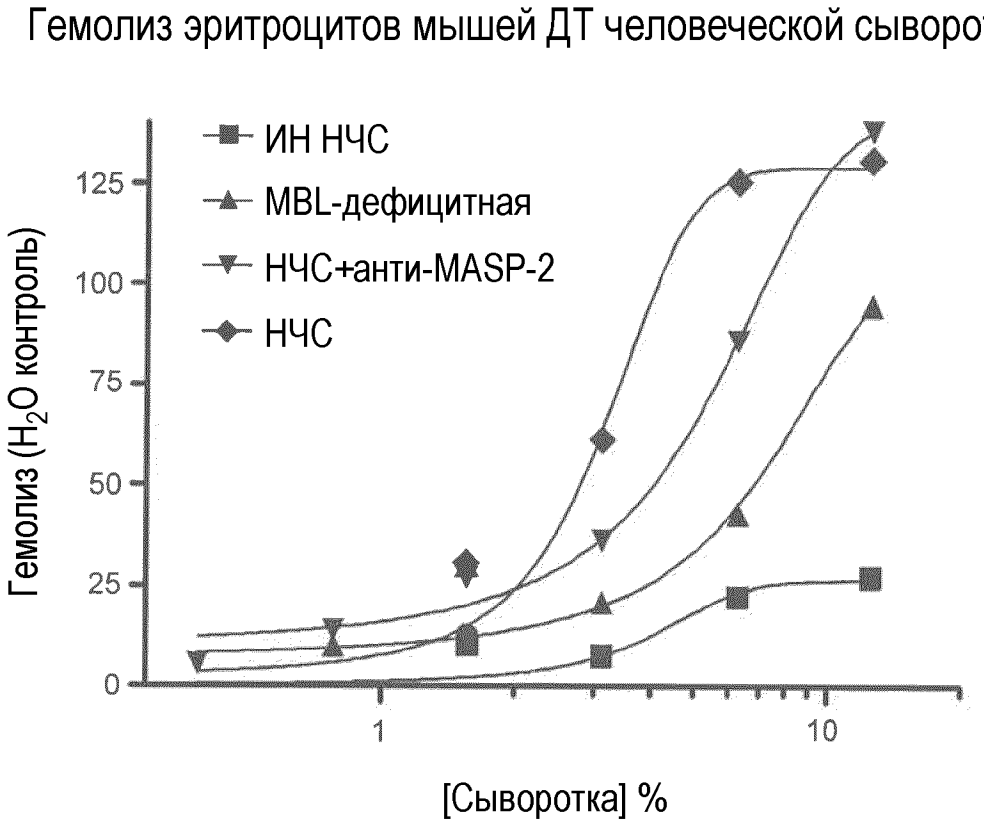
ФИГ.39


A (Сыворотка ДТ)
B (MASP-2 -/-)
C (MBL A/C -/-)
D (ИНС)
Log КОЕ/мл
7
6
5
4
3
0
15
30
45
60
75
90
105
120
**
***
ВРЕМЯ (МИНУТЫ)

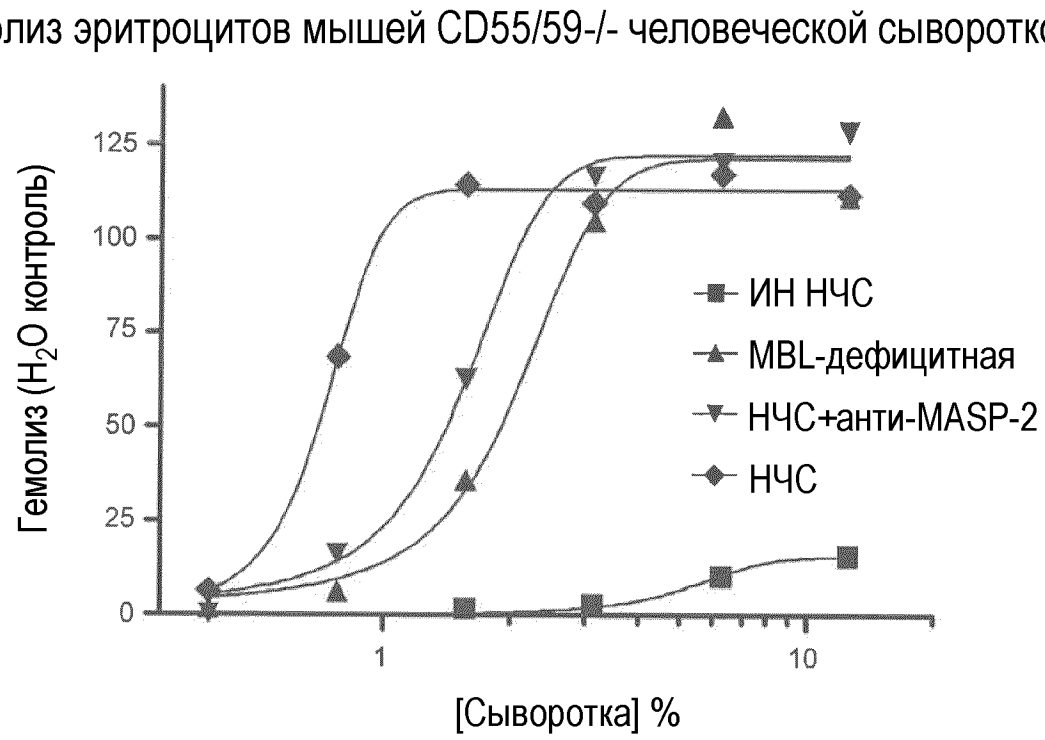
ФИГ.40


Гемолиз покрытых маннаном мышиных эритроцитов человеческой сывороткой
OD 415 нм
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1
10
[Сыворотка] %
ИН НЧС
MBL-/-
НЧС+анти-MASP-2
НЧС

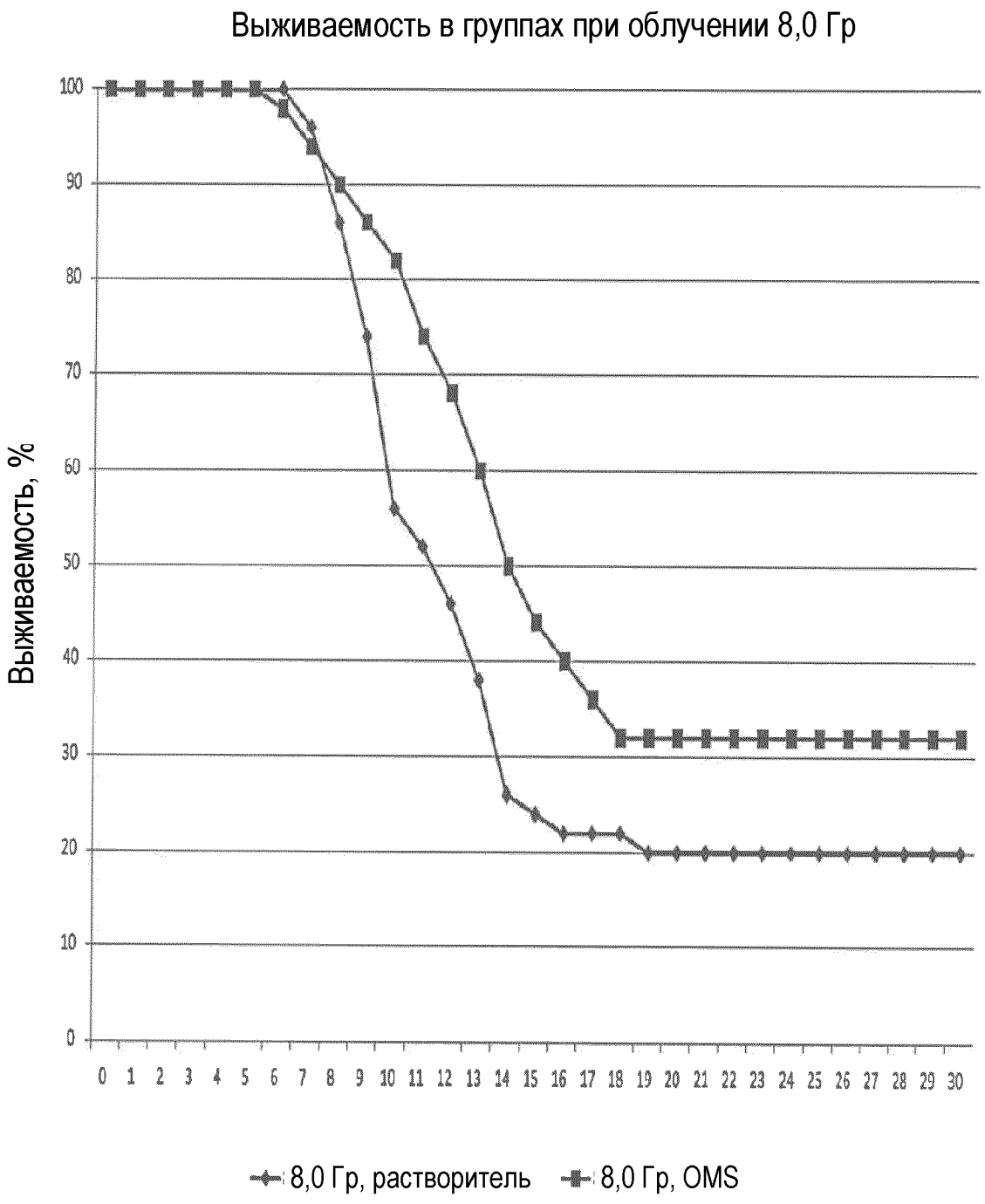
ФИГ.41


Гемолиз эритроцитов мышей ДТ человеческой сывороткой
ИН НЧС
MBL-дефицитная
НЧС+анти-MASP-2
НЧС
Гемолиз (H_2O контроль)
125
100
75
50
25
0
1
10
[Сыворотка] %

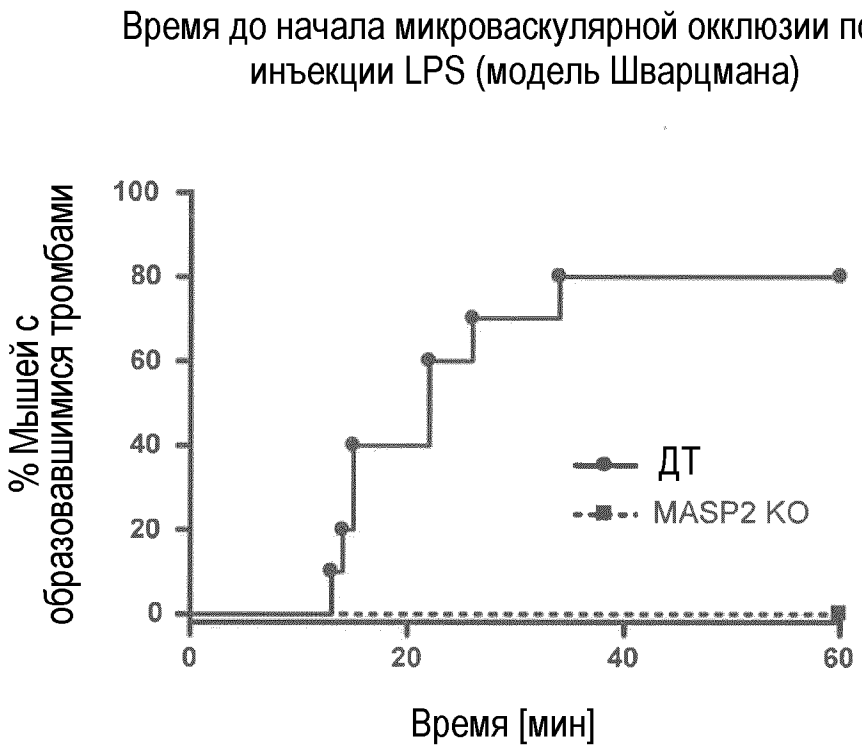
ФИГ.42


Гемолиз эритроцитов мышей CD55/59-/- человеческой сывороткой
Гемолиз (H_2O контроль)
125
100
75
50
25
0
1
10
[Сыворотка] %
ИН НЧС
MBL-дефицитная
НЧС+анти-MASP-2
НЧС

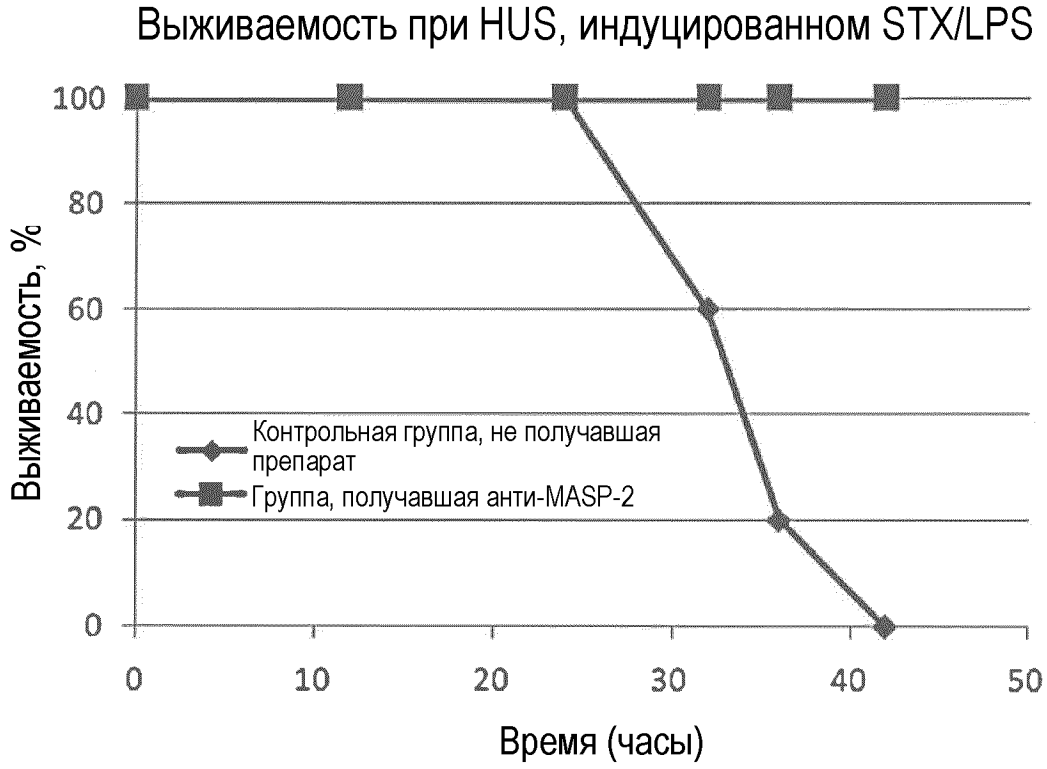
ФИГ.43


Выживаемость в группах при облучении 8,0 Гр
Выживаемость, %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 1 2 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
8,0 Гр, растворитель
8,0 Гр, OMS

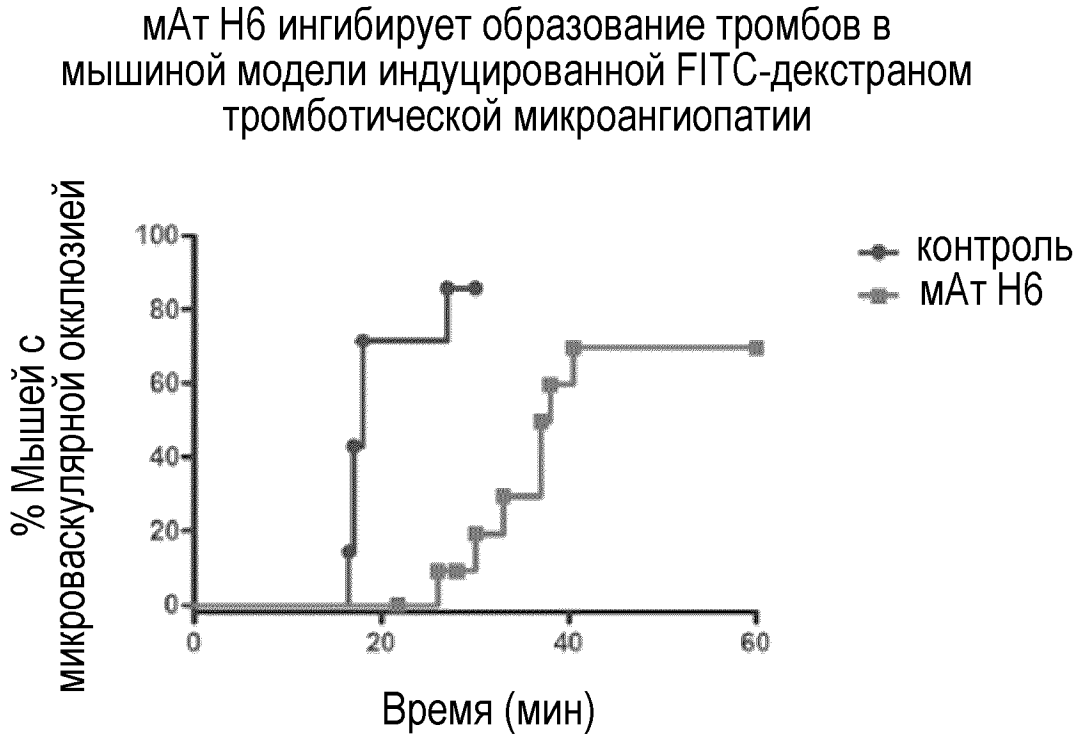
ФИГ.44


Время до начала микроваскулярной окклюзии после инъекции LPS (модель Шварцмана)
% Мышей с образовавшимися тромбами
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
ДТ
MASP2 KO
Время [мин]

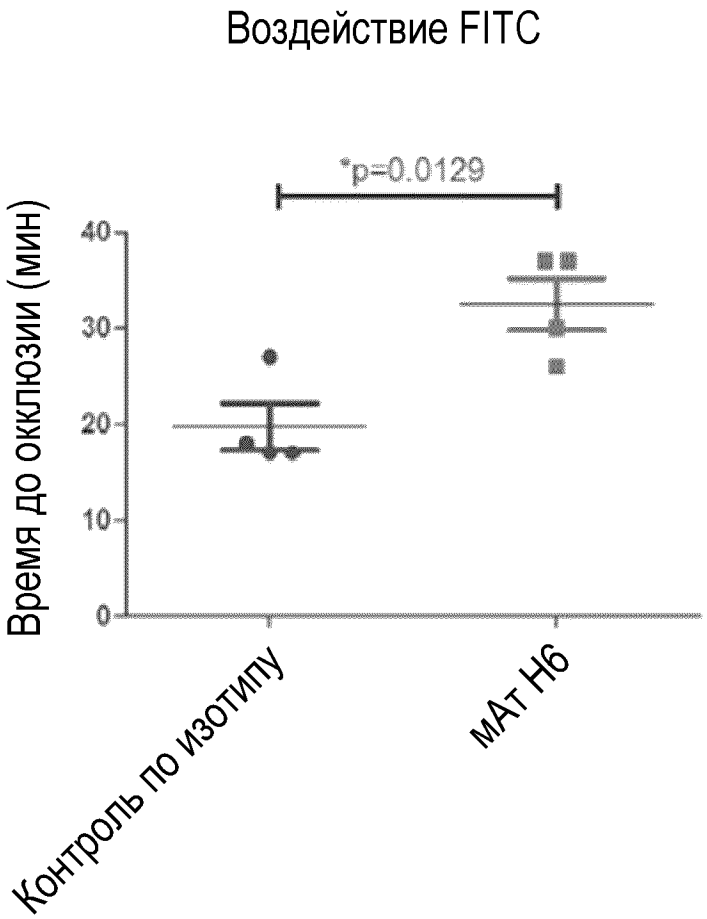
ФИГ.45


Выживаемость при HUS, индуцированном STX/LPS
Выживаемость, %
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
Время (часы)
Контрольная группа, не получавшая препарат
Группа, получавшая анти-MASP-2

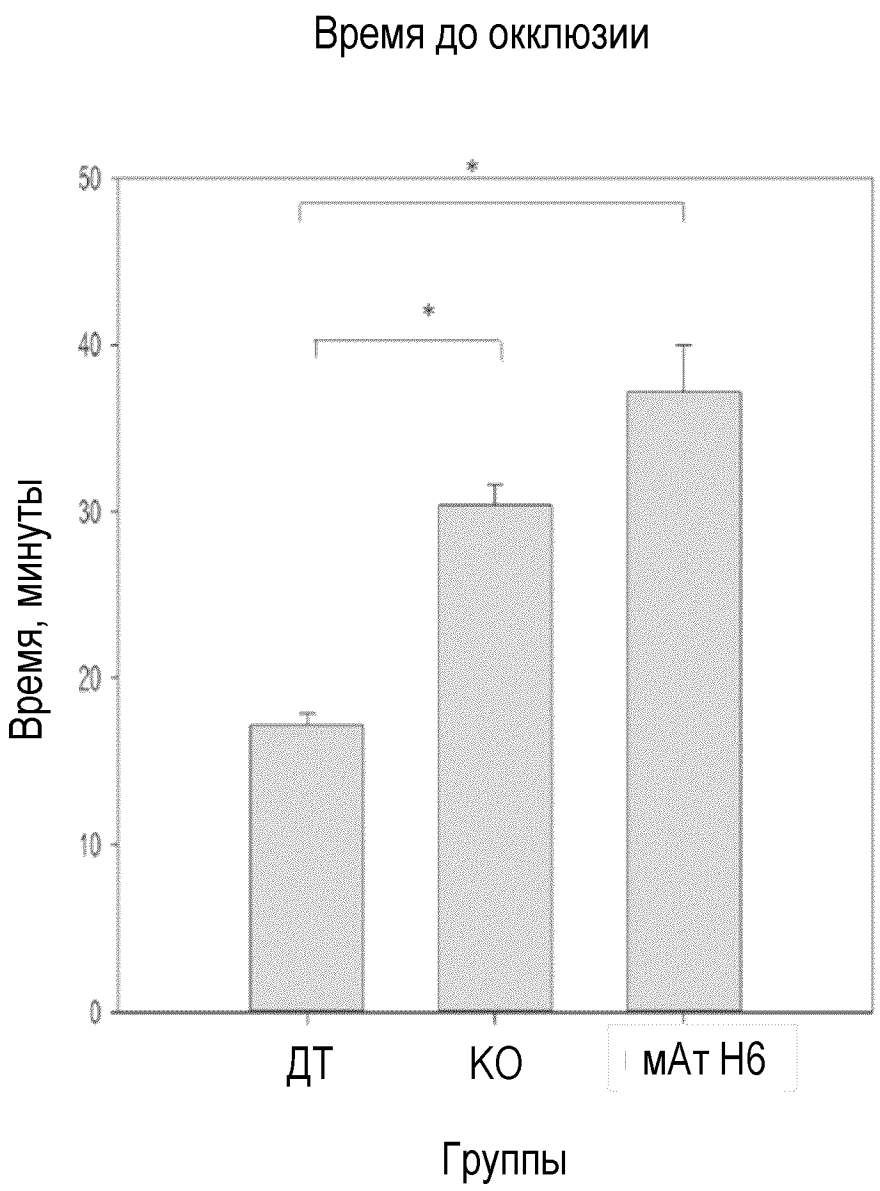
ФИГ.46


мАт H6 ингибирует образование тромбов в мышиной модели индуцированной FITC-декстраном тромботической микроангиопатии
% Мышей с микроваскулярной окклюзией
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
Время (мин)
контроль
мАт H6

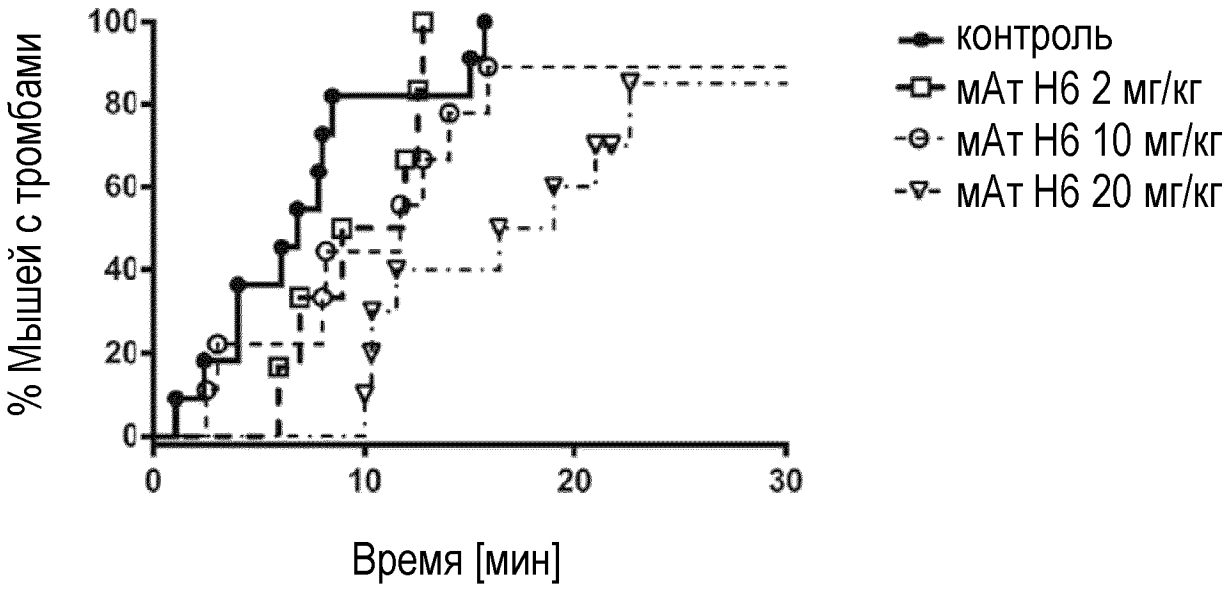
ФИГ.47


Воздействие FITC
*p=0.0129
Время до окклюзии (мин)
40
30
20
10
0
Контроль по изотипу
мАт H6

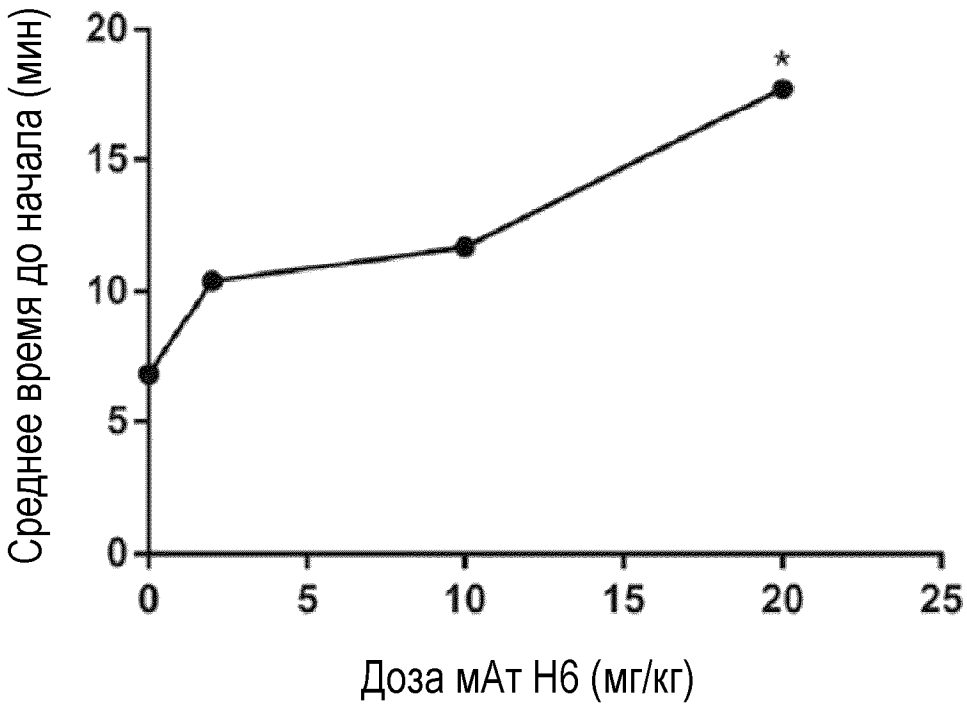
ФИГ.48


Время до окклюзии
Время, минуты
50
40
30
20
10
0
*
*
ДТ
КО
мАт Н6
Группы

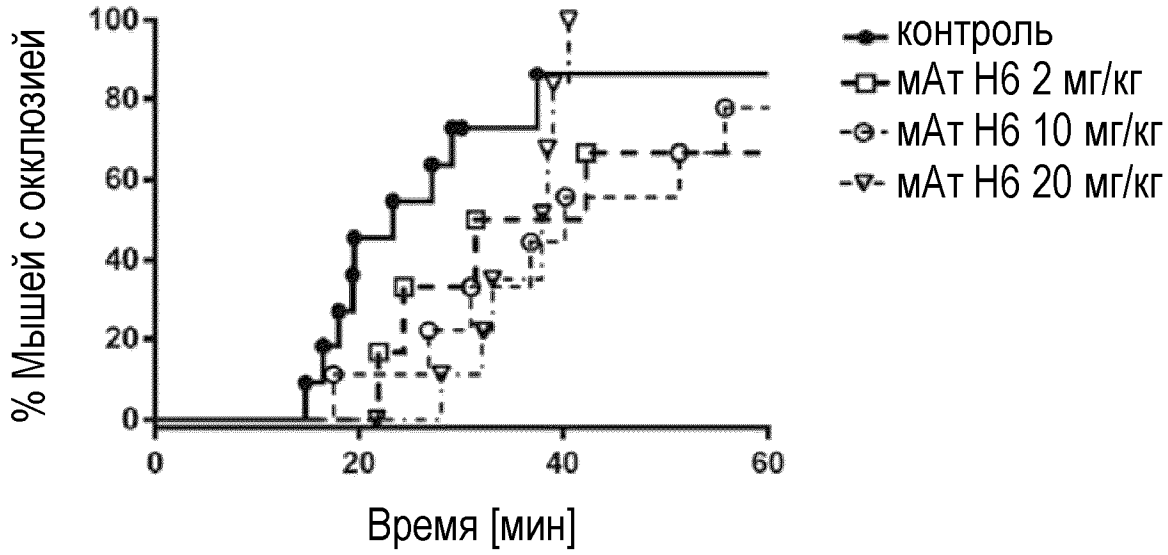
ФИГ.49


% Мышей с тромбами
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
Время [мин]
контроль
мАт H6 2 мг/кг
мАт H6 10 мг/кг
мАт H6 20 мг/кг

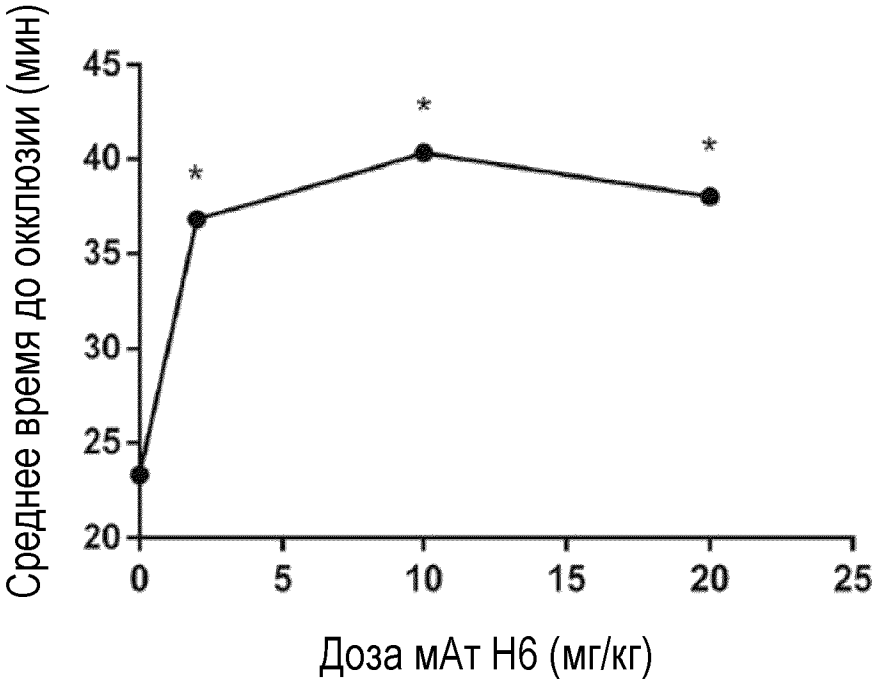
ФИГ.50


Среднее время до начала (мин)
20
15
10
5
0
*
0
5
10
15
20
25
Доза мАт H6 (мг/кг)

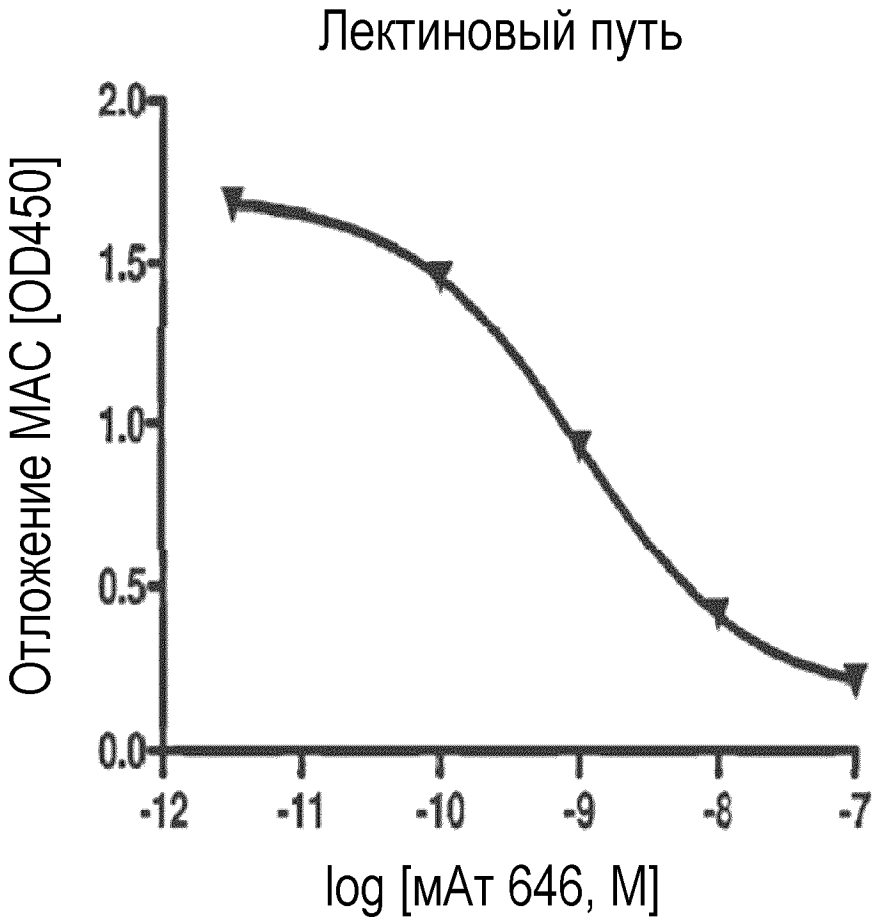
ФИГ.51


% Мышей с окклюзией
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
Время [мин]
контроль
мАт H6 2 мг/кг
мАт H6 10 мг/кг
мАт H6 20 мг/кг

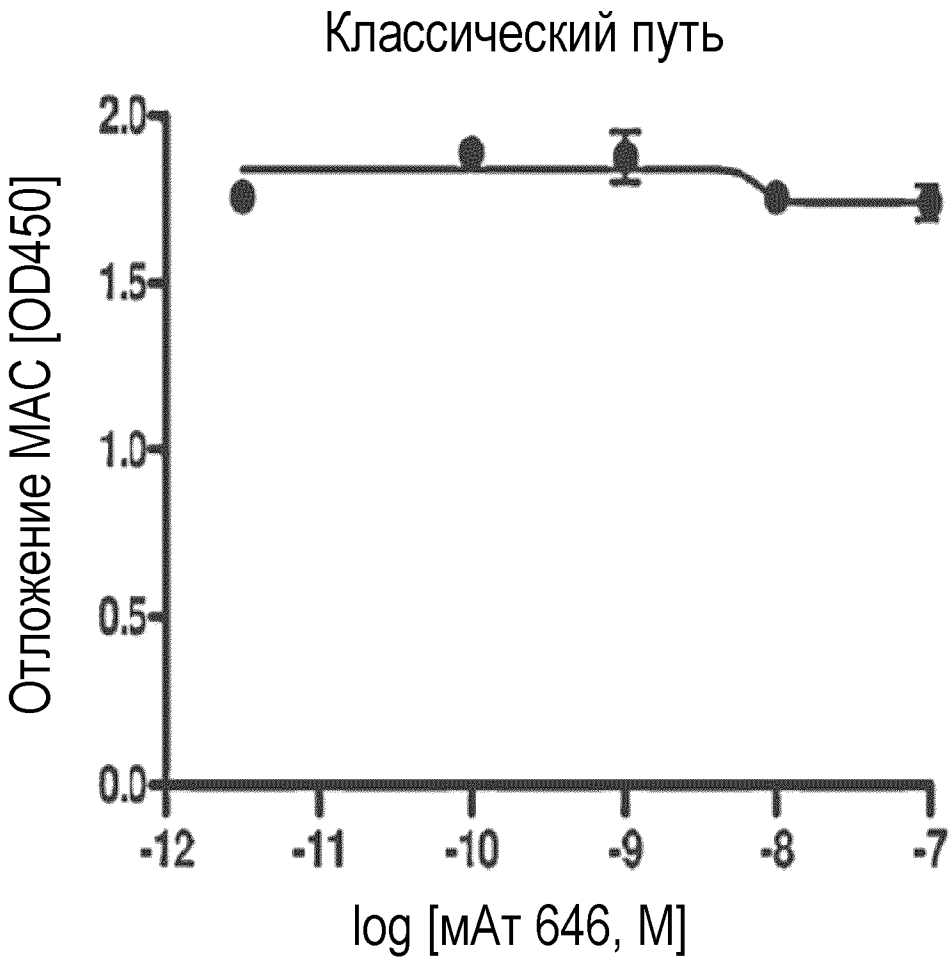
ФИГ.52


Среднее время до окклюзии (мин)
45
40
35
30
25
20
0
5
10
15
20
25
*
*
*
Доза мАт H6 (мг/кг)

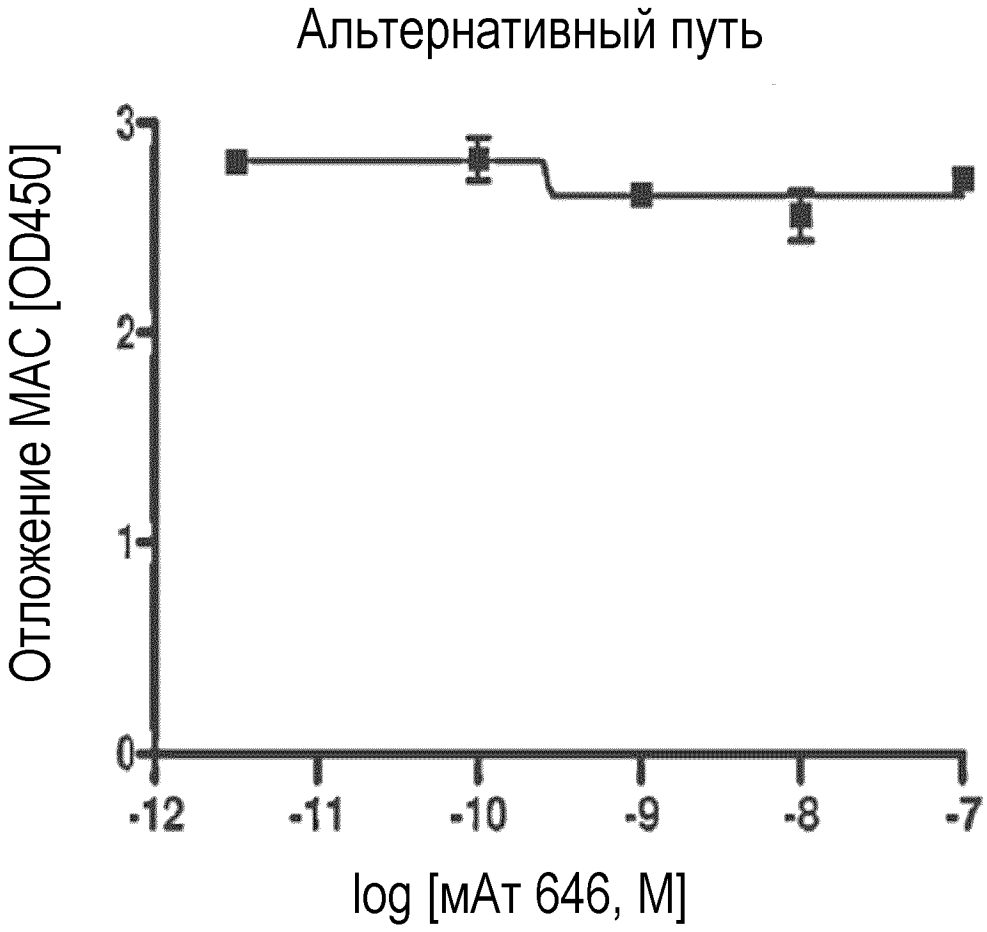
ФИГ.53А


Лектиновый путь
Отложение МАС [OD450]
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log [мАт 646, М]

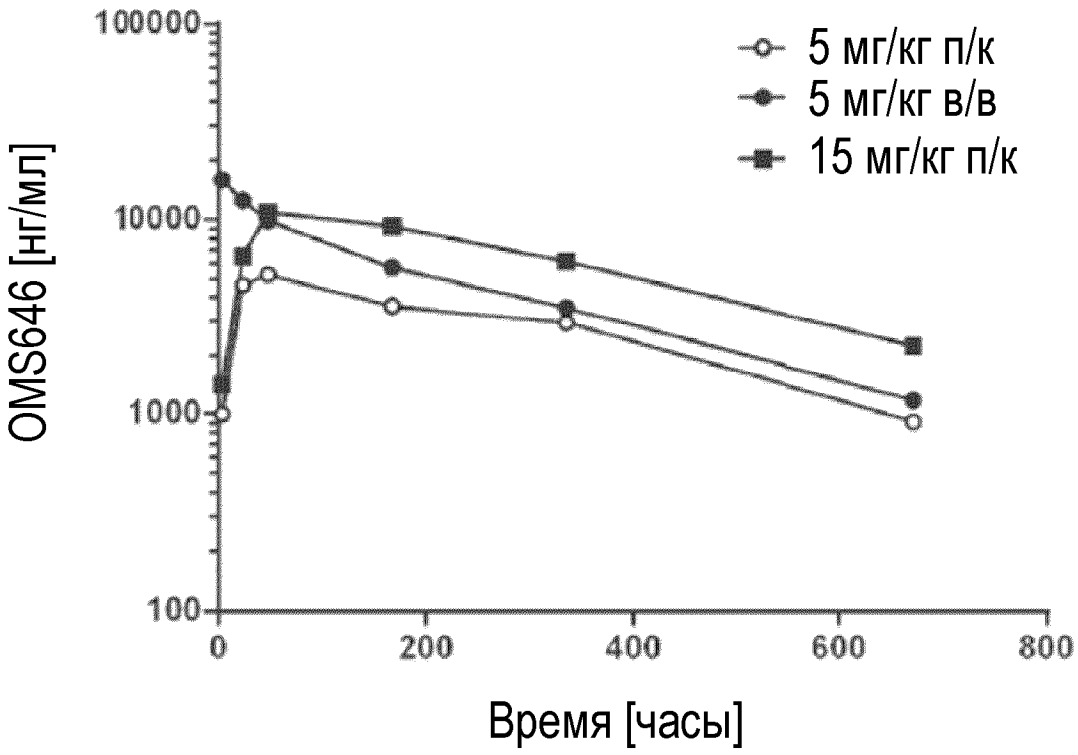
ФИГ.53B


Классический путь
Отложение MAC [OD450]
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log [мАт 646, M]

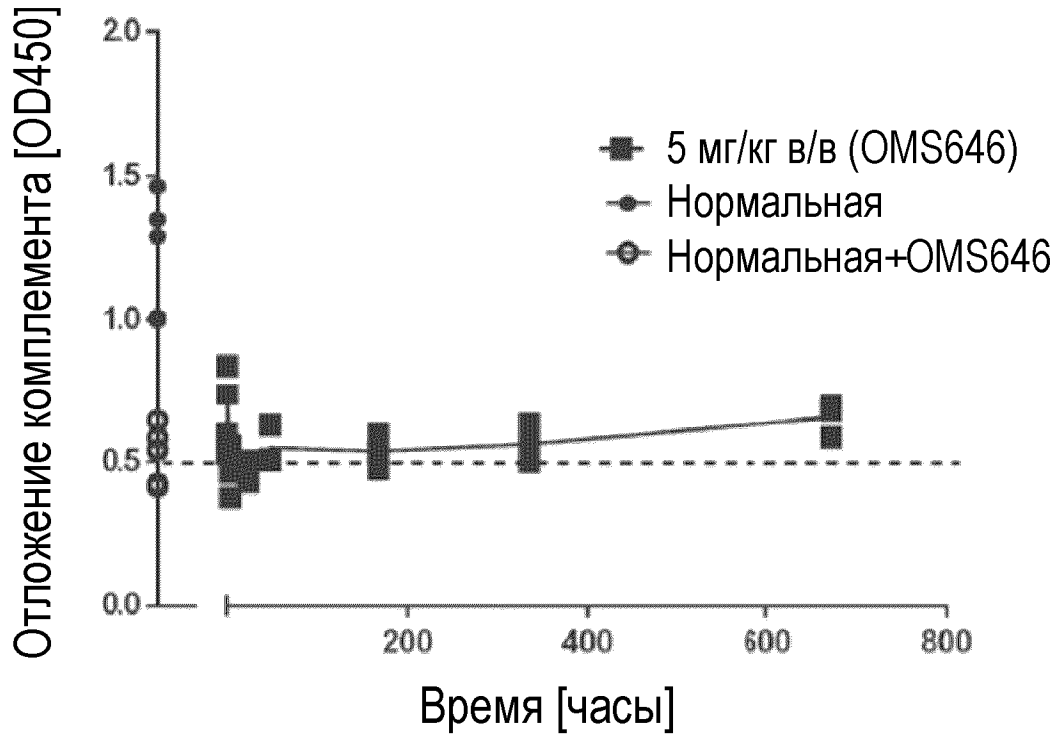
ФИГ.53С


Альтернативный путь
Отложение МАС [OD450]
3
2
1
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log [мАт 646, М]

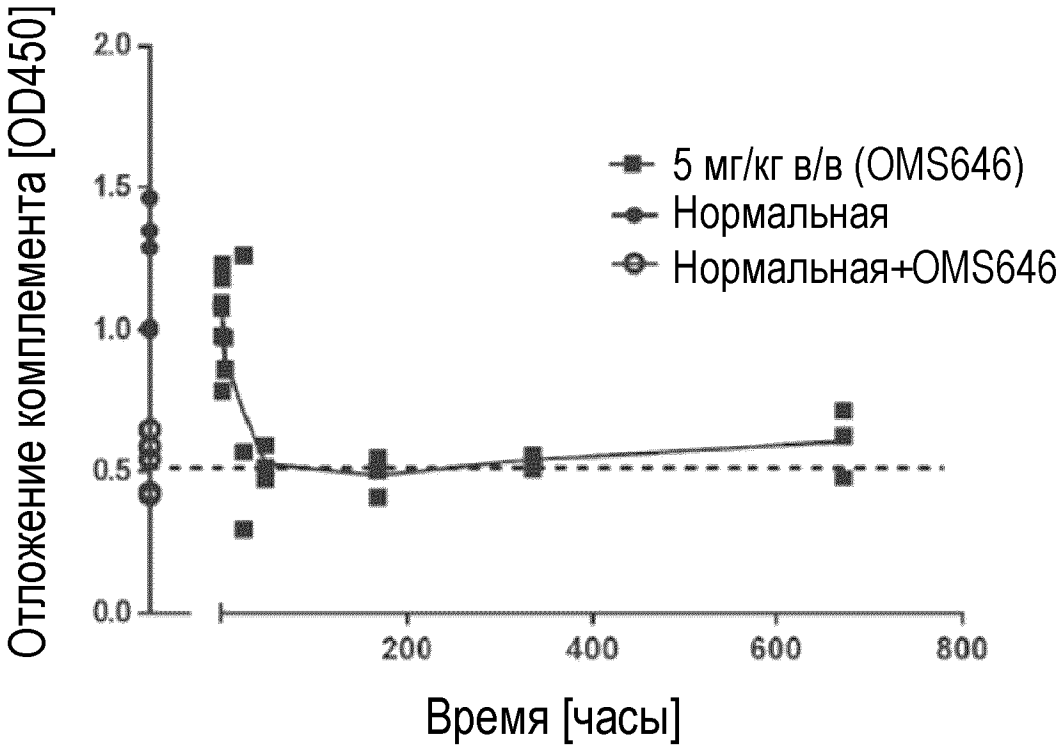
ФИГ.54


100000
10000
1000
100
0
200
400
600
800
OMS646 [нг/мл]
Время [часы]
5 мг/кг п/к
5 мг/кг в/в
15 мг/кг п/к

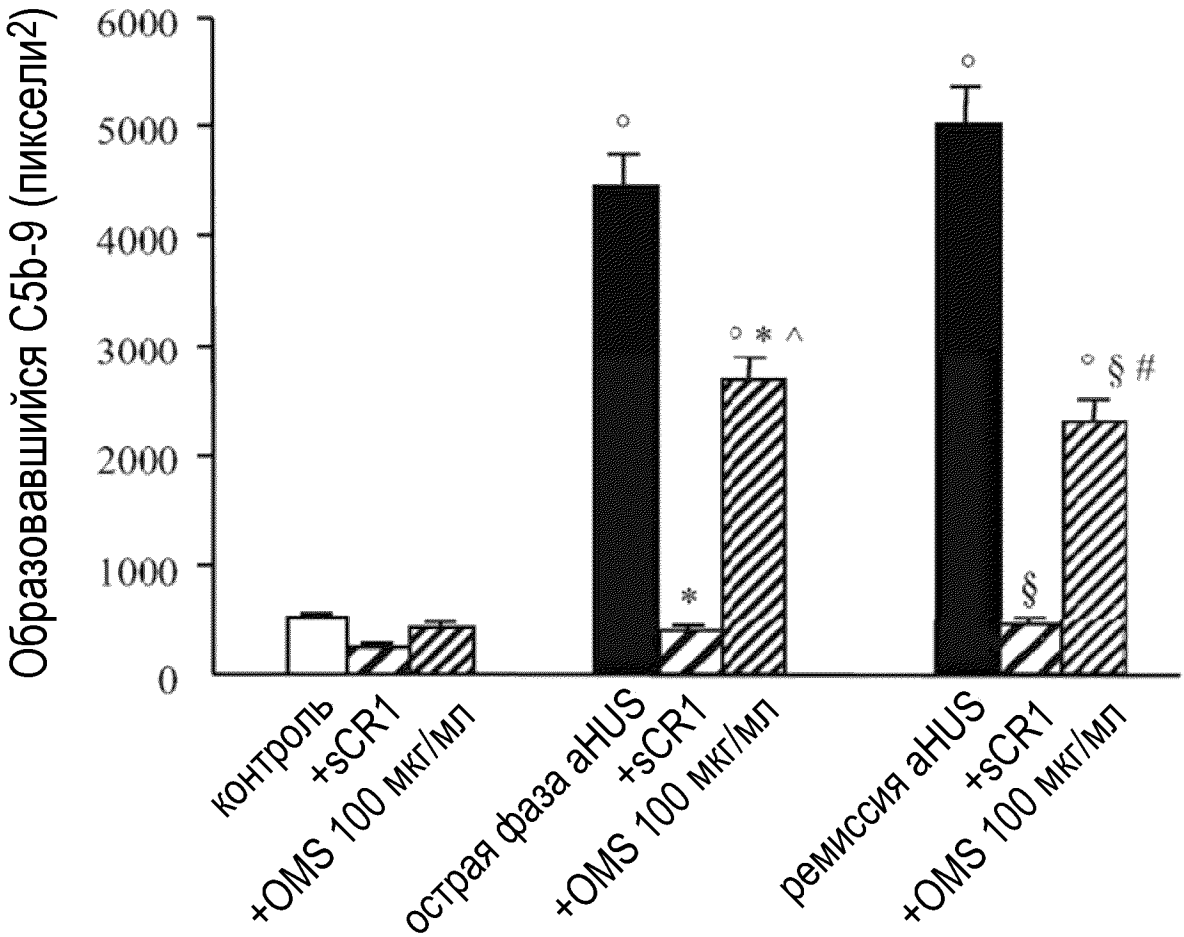
ФИГ.55А


Отложение комплемента [OD450]
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
200
400
600
800
Время [часы]
5 мг/кг в/в (OMS646)
Нормальная
Нормальная+OMS646

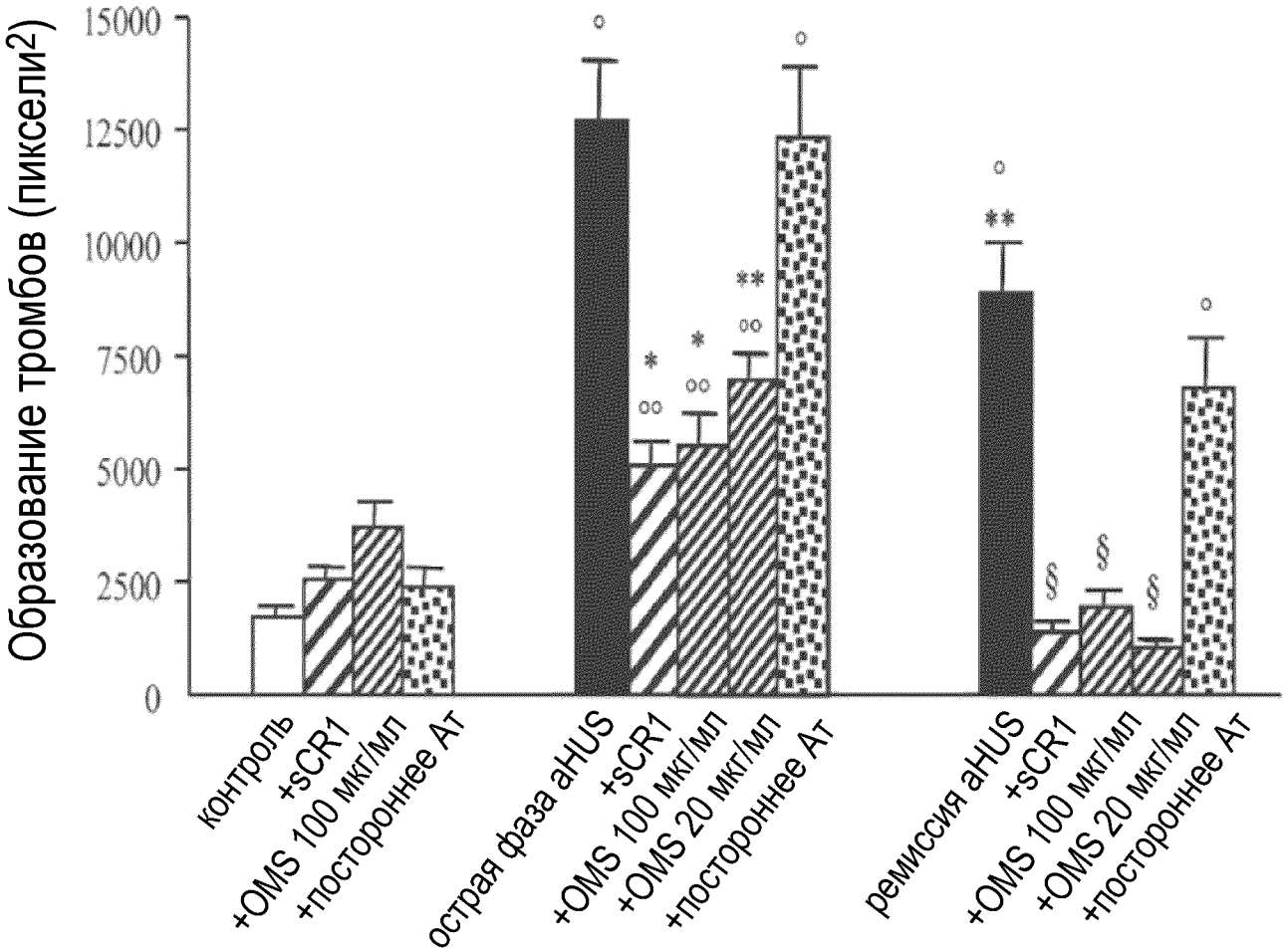
ФИГ.55B


Отложение комплемента [OD450]
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
200
400
600
800
Время [часы]
5 мг/кг в/в (OMS646)
Нормальная
Нормальная+OMS646

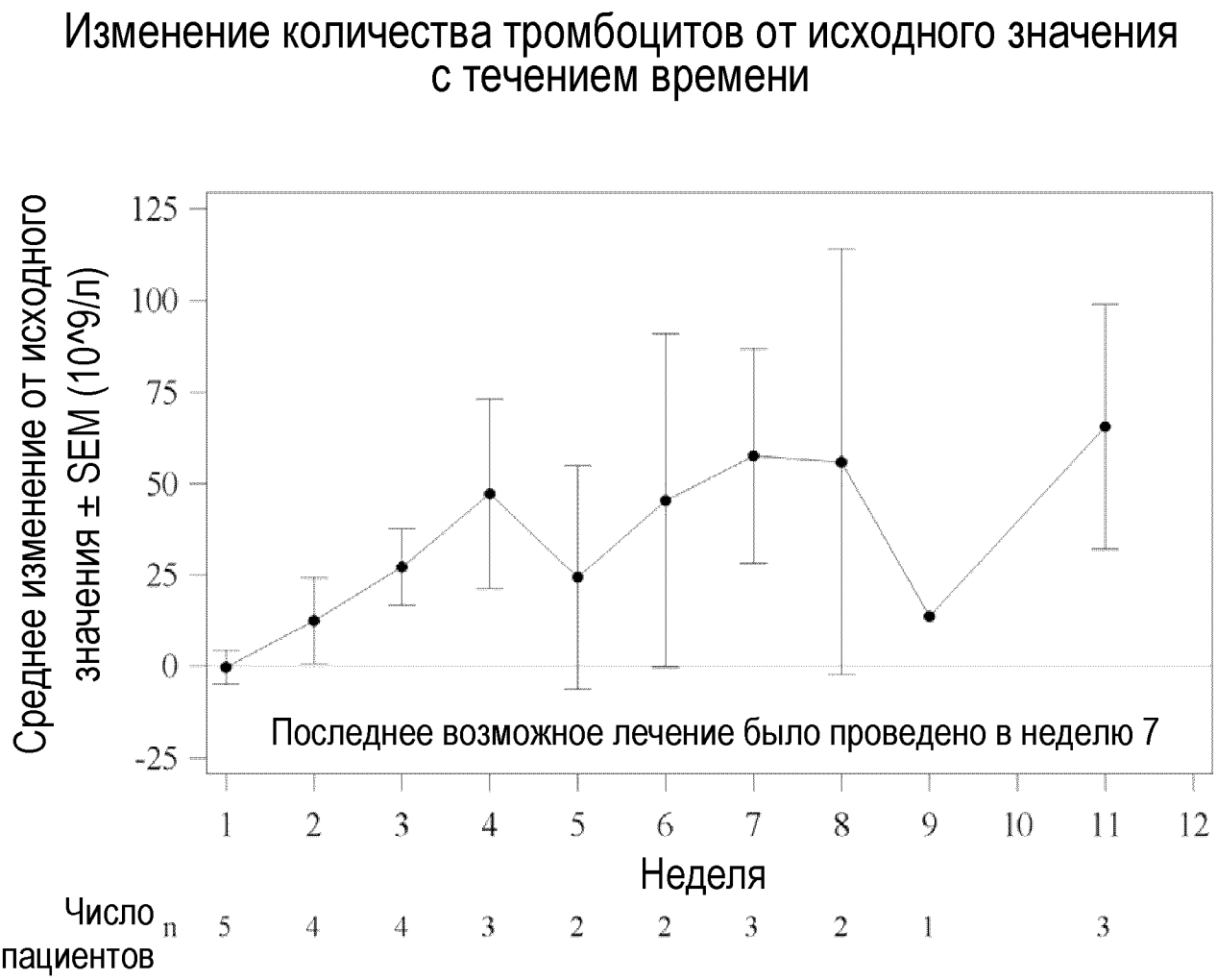
ФИГ.56


Образовавшийся C5b-9 (пиксели²)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
°
°
*
°*^
§
°§#
контроль
+sCR1
+OMS 100 мкг/мл
острая фаза aHUS
+sCR1
+OMS 100 мкг/мл
ремиссия aHUS
+sCR1
+OMS 100 мкг/мл

ФИГ.57

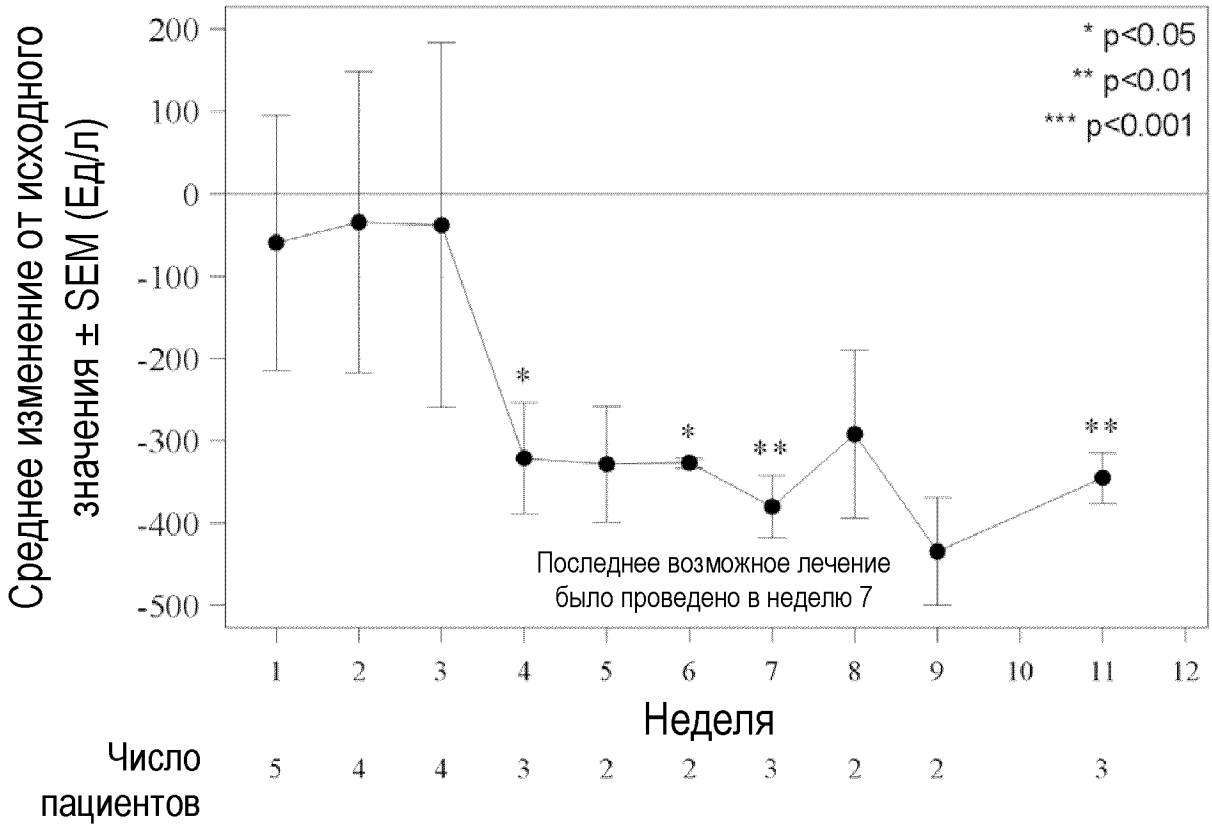

Образование тромбов (пиксели²)
15000
12500
10000
7500
5000
2500
0
контроль
+sCR1
+OMS 100 мкг/мл
+постороннее Ат
острая фаза aHUS
+sCR1
+OMS 100 мкг/мл
+OMS 20 мкг/мл
+постороннее Ат
ремиссия aHUS
+sCR1
+OMS 100 мкг/мл
+OMS 20 мкг/мл
+постороннее Ат

ФИГ.58

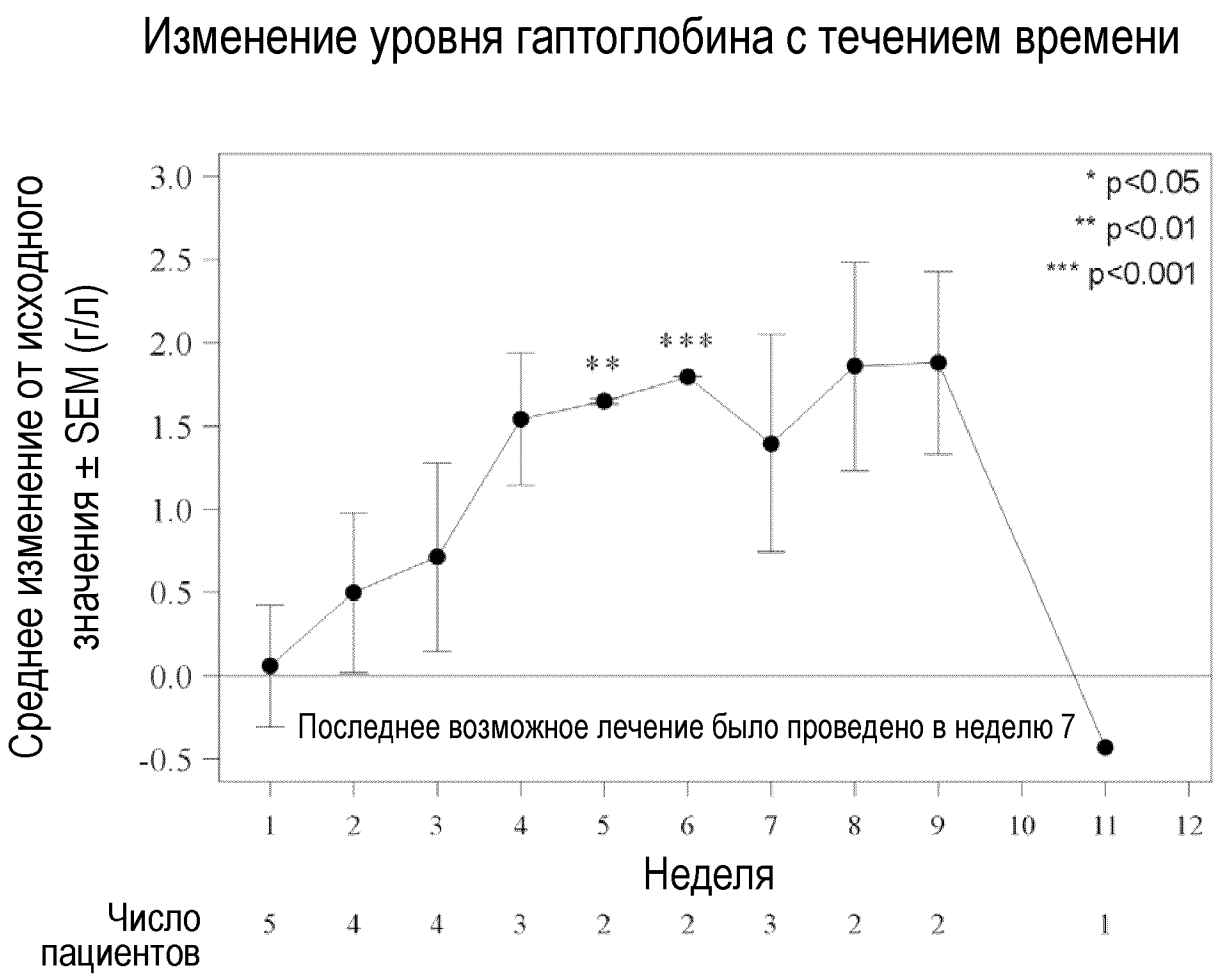

Изменение количества тромбоцитов от исходного значения с течением времени
Среднее изменение от исходного значения ± SEM (10^9/л)
125
100
75
50
25
0
-25
Последнее возможное лечение было проведено в неделю 7
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
Неделя
Число пациентов
n
5
4
4
3
2
2
3
2
1
3

ФИГ.59

Изменение LDH от исходного значения с течением времени



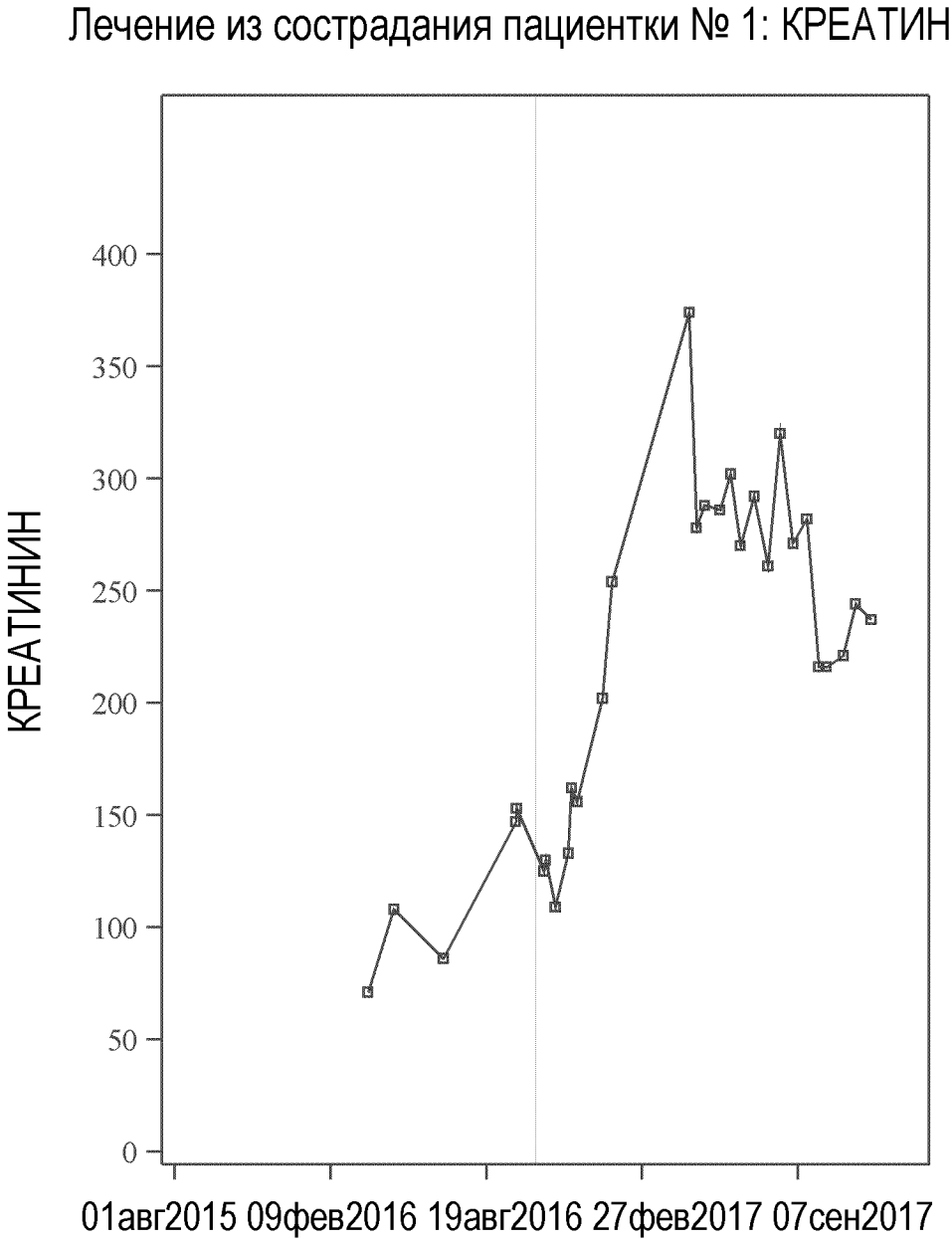
ФИГ.60


Изменение уровня гаптоглобина с течением времени
Среднее изменение от исходного значения ± SEM (г/л)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
* p<0.05
** p<0.01
*** p<0.001
**
***
Последнее возможное лечение было проведено в неделю 7
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
Неделя
Число пациентов
5
4
4
3
2
2
3
2
2
1

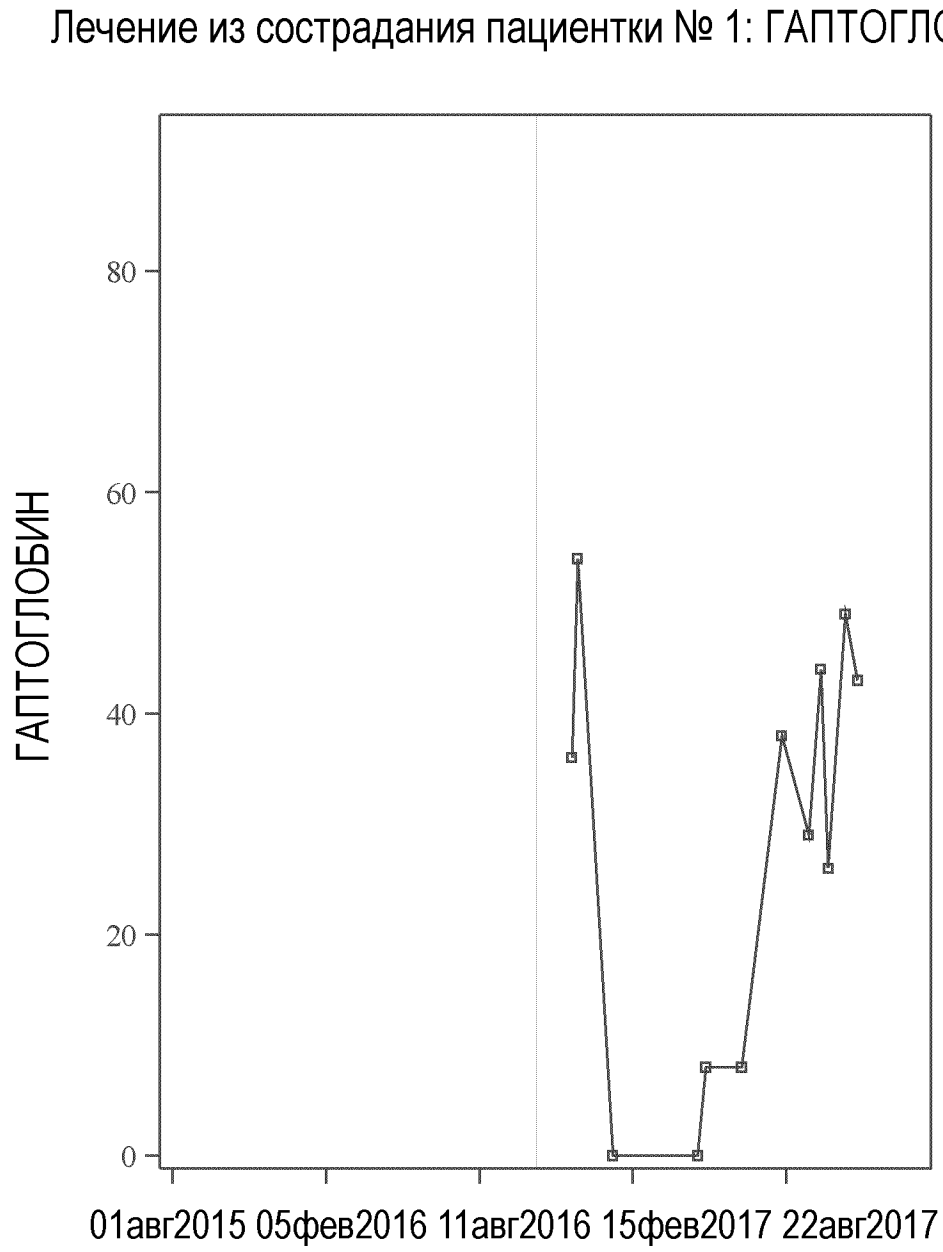
ФИГ.61


OMS646
GvHD
Состояние GvHD сохранялось, несмотря на уменьшение доз CSA
Токсичность отсутствует
HSCT
35
121
210
263
270
277
284
291
298
305
312
319
326
333
340
354
days
Прекращение мелены и гемолиза, увеличение количества тромбоцитов
Улучшение клинических и электрофизиологических показателей сенсорно-двигательных нарушений
Дальнейшее неврологическое улучшение, начало устранения проблем с мочеиспусканием

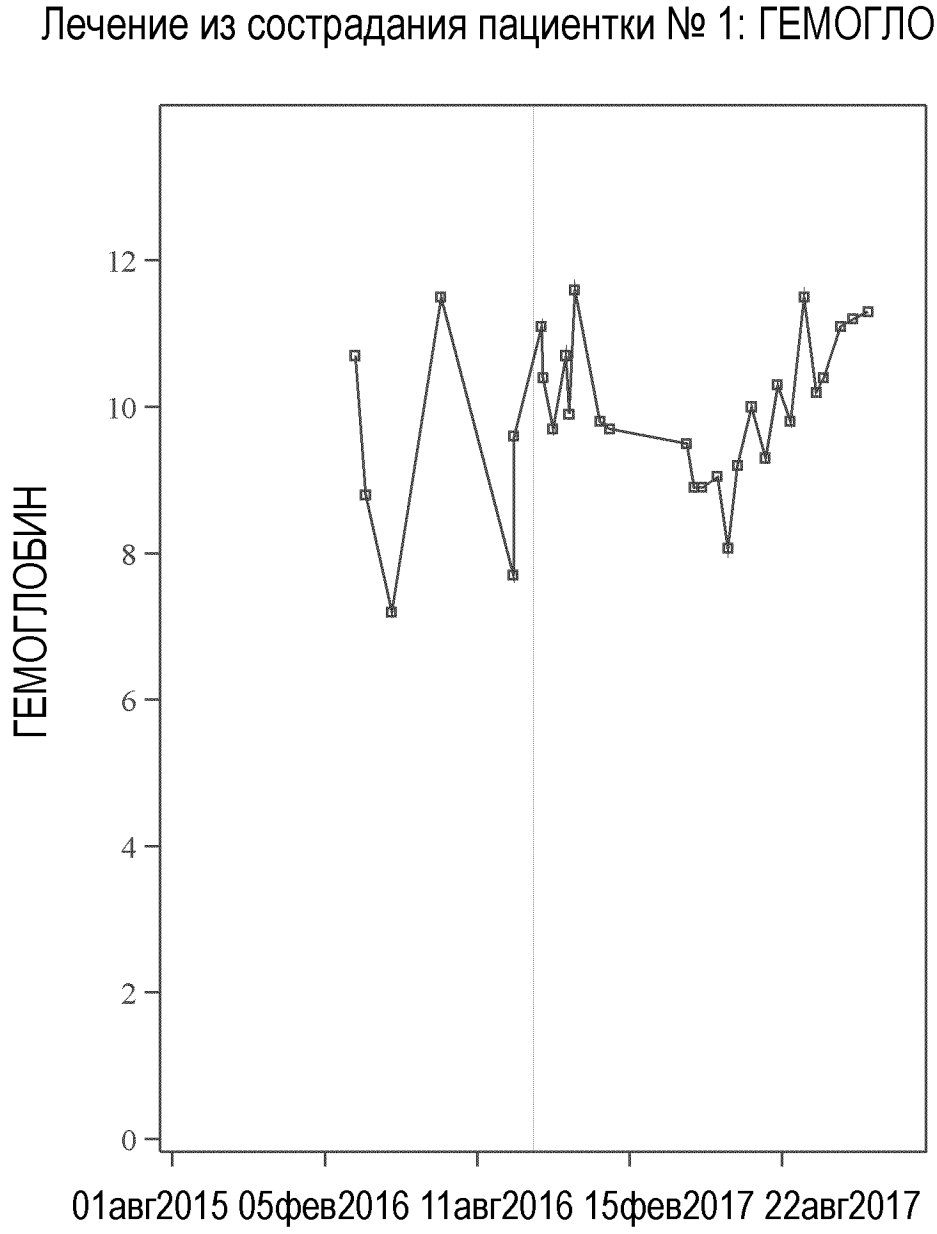
ФИГ.62А


Лечение из сострадания пациентки № 1: КРЕАТИНИН
КРЕАТИНИН
400
350
300
250
200
150
100
50
0
01авг2015
09фев2016
19авг2016
27фев2017
07сен2017

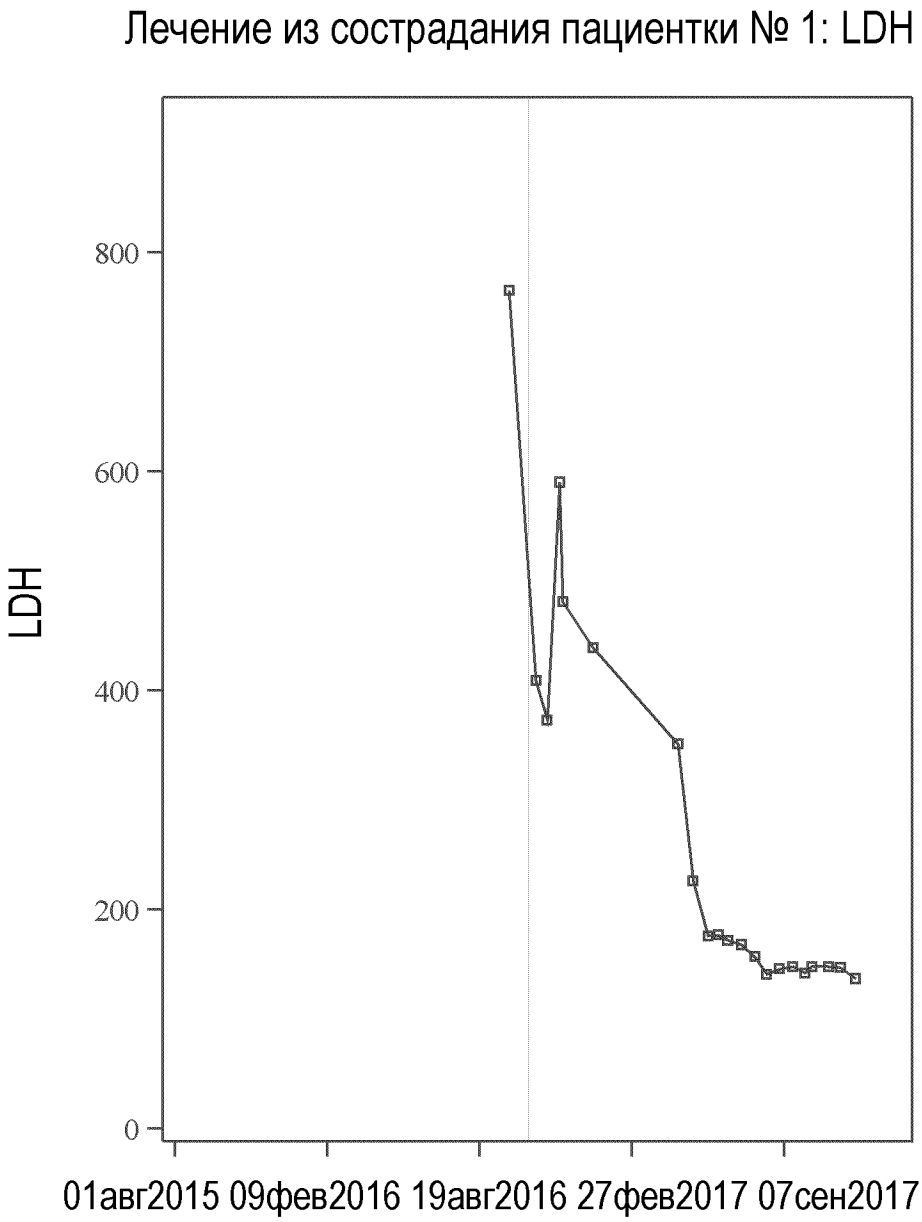
ФИГ.62B


Лечение из сострадания пациентки № 1: ГАПТОГЛОБИН
ГАПТОГЛОБИН
80
60
40
20
0
01авг2015
05фев2016
11авг2016
15фев2017
22авг2017

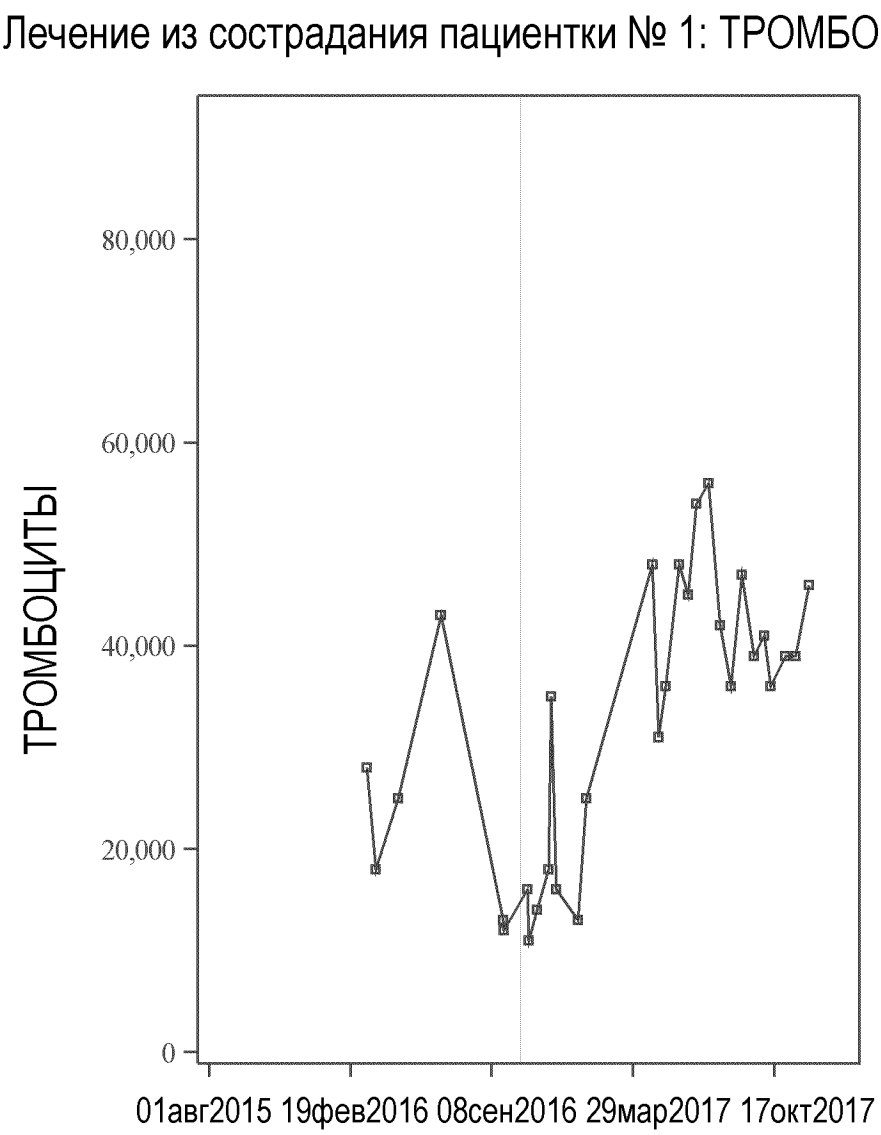
ФИГ.62С


Лечение из сострадания пациентки № 1: ГЕМОГЛОБИН
ГЕМОГЛОБИН
12
10
8
6
4
2
0
01авг2015
05фев2016
11авг2016
15фев2017
22авг2017

ФИГ.62D


Лечение из сострадания пациентки № 1: LDH
LDH
800
600
400
200
0
01авг2015
09фев2016
19авг2016
27фев2017
07сен2017

ФИГ.62E


Лечение из сострадания пациентки № 1: ТРОМБОЦИТЫ
ТРОМБОЦИТЫ
80,000
60,000
40,000
20,000
0
01авг2015
19фев2016
08сен2016
29мар2017
17окт2017